

THESES

PRESENTEES A LA FACULTE DE
PHARMACIE DE L'UNIVERSITE DE
NANCY POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR EN PHARMACIE (Doctorat d'état)

PAR GERARD SIEST

Pharmacien
Licencié ès- Sciences
Ex-Interne des Hôpitaux de Nancy

Titulaire des C.E.Sup. de Chimie biologique
et de Microbiologie, Sérologie et Parasitologie,
Et des C.E.Sp. d'Hématologie,
de Sérologie appliquée,
de Biochimie pharmaceutique et technique
et de Bactériologie pharmaceutique et technique.
Chef de Travaux à la Faculté de Pharmacie de Nancy

ETUDE DES REACTIONS COLOREES DE L'UREE
ET DES DERIVES CARBAMIDES AVEC DES ALPHA-DICETONES
APPLICATIONS BIOLOGIQUES

SOUTENUES LE 17 DECEMBRE 1966, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. le Professeur SOLEIL

Président

Melle le Professeur BESSON

Juges

M. le Professeur PIERFITTE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555808_0019

THESES

PRESENTEES A LA FACULTE DE
PHARMACIE DE L'UNIVERSITE DE
NANCY POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR EN PHARMACIE (Doctorat d'état)

PAR GERARD SIEST

Pharmacien
Licencié ès- Sciences
Ex-Interne des Hôpitaux de Nancy

Titulaire des C.E.Sup. de Chimie biologique
et de Microbiologie, Sérologie et Parasitologie,
Et des C.E.Sp. d'Hématologie,
de Sérologie appliquée,
de Biochimie pharmaceutique et technique
et de Bactériologie pharmaceutique et technique.
Chef de Travaux à la Faculté de Pharmacie de Nancy

ETUDE DES REACTIONS COLOREES DE L'UREE
ET DES DERIVES CARBAMIDES AVEC DES ALPHA-DICETONES
APPLICATIONS BIOLOGIQUES

SOUTENUES LE 17 DECEMBRE 1966, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. le Professeur SOLEIL

Président

Melle le Professeur BESSON

Juges

M. le Professeur PIERFITTE



ADMINISTRATION

Doyen : Professeur A. BERNANOSE

Assesseur : Professeur A. MEUNIER

Secrétaire Principal : B. SEUROT

Doyen honoraire : M. RICHARD
Recteur de l'Académie de MONTPELLIER

Professeur honoraire : M. CORDEBARD

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs

M.	MEUNIER A.	Pharmacie galénique
Melle	FRANCOIS M. Th.	Matière Médicale
MM.	FRANQUET R.	Botanique
	MARCHAL J.G.	Microbiologie
	STEIMETZ E.	Sciences Naturelles
	SOLEIL J.	Pharmacie chimique
	BERNANOSE A.	Physique
Melle	BESSON S.	Pharmacodynamie
M.	BENE R.	Sciences biologiques

Professeurs sans chaire

MM.	MIRJOLET M.	Chimie analytique
	PIERFITTE M.	Chimie biologique
	PELT J.M.	Matière médicale

Maître de conférence agrégé

M.	MARTIN J.A.	Chimie minérale
----	-------------	-----------------

Chargés de cours complémentaires

M.	MEUNIER A.	Hydrologie - notions de législation pharmaceutique et d'orientation professionnelle
Melle	FRANCOIS M. Th.	Hygiène
MM.	FRANQUET R.	Cryptogamie
	MARCHAL J.G.	Parasitologie
	STEIMETZ E.	Mycologie - Minéralogie
	SOLEIL J.	Chimie organique
	BERNANOSE A.	Optique et Acoustique - Physique biologique
Melle	BESSION S.	Application thérapeutique de la pharmacodynamie
MM.	BENE R.	Zoologie - biologie
	LAGARDE P (F. Droit)	Déontologie et législation pharmaceutique
	PIERFITTE M.	C.E.S. Chimie biologique
	PELT J.M.	Botanique générale
	BOYER P.	Notions de mathématiques appliquées aux sciences expérimentales - physique
	LOPPINET V.	Notions de chimie organique
	DIXNEUF P.	Travaux dirigés de mathématiques

Chefs de Travaux

Mme	LASSEUR A.	Microbiologie - parasitologie
Melle	GIRARD Th.	Zoologie - biologie
MM.	SIEST G. (Stagiaire)	Chimie biologique
	AIMOND P. (Délégué)	Chimie analytique quantitative
	LOPPINET V.	Pharmacotechnie - chimique
	HAYON J.C.	Micrographie
	SCHWARTZBROD L.	C.E.S. Microbiologie
	BAUDOT Ph.	Chimie analytique qualitative
	BRAUN Cl.	Physique
	JACQUE M.	Pharmacodynamie
	VIGNERON Cl.	Sciences pharmaceutiques

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver, ni les imputer.

MEIS ET AMICIS

A la mémoire de Monsieur le Doyen KAYSER

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur SOLEIL

Professeur de Pharmacie Chimique et de Chimie Organique à la
Faculté de Pharmacie de Nancy
Pharmacien des Hôpitaux

A NOS JUGES

Mademoiselle le Professeur BESSON

Professeur de Pharmacodynamie

Monsieur le Professeur PIERFITTE

Professeur de Chimie Biologique

A MONSIEUR LE DOYEN BERNANOSE

Professeur de Physique

A TOUS NOS MAITRES

AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué sous la direction de Melle BESSON, Professeur de Pharmacodynamie, à qui nous exprimons ici notre respectueuse affection ainsi que notre vive reconnaissance pour son aide précieuse. Durant notre séjour dans son laboratoire, elle resta pour nous un guide attentif et dévoué.

C'est aussi à Monsieur le Doyen KAYSER, que nous devons de pouvoir présenter cette étude. Il a été présent à chaque étape de notre carrière universitaire. A notre arrivée à NANCY, il nous reçut et nous conseilla de préparer l'internat, puis nous encouragea à rester à la Faculté et à préparer une thèse. Après nous avoir confié les travaux pratiques de chimie biologique, Monsieur le Doyen KAYSER par ses conseils éclairés nous guida dans nos travaux et nos fonctions. Disparu alors qu'il s'apprêtait à juger ce travail, aucun mot ne peut traduire la douleur et le vide profond qui suivirent. Il restera pour nous un exemple.

Monsieur SOLEIL, Professeur de pharmacie chimique a bien voulu accepter de présider le Jury de cette thèse. Il nous a toujours aidé avec bienveillance et ses conseils nous ont été très précieux. Nous l'assurons de notre profond respect et lui témoignons toute notre gratitude. Nous tenons aussi à lui exprimer notre vive admiration pour les cours magistraux que nous avons eu le plaisir d'entendre comme étudiant et qui seront pour nous un modèle à suivre.

Monsieur PIERFITTE, Professeur de chimie biologique, nous a toujours prodigué son assistance amicale aussi bien dans nos fonctions que dans nos travaux. Son aide fut particulièrement précieuse pour la rédaction de ce travail. Nous lui adressons nos bien vifs remerciements avec l'assurance de notre respectueuse amitié.

Nous n'aurions garde d'oublier à cette occasion, l'enseignement de tous nos Maîtres des Facultés de Pharmacie, Sciences et Médecine, et des Hôpitaux.

INTRODUCTION

Parmi les composés qui entrent pour une large part dans l'histoire de la chimie biologique, l'urée occupe une place prépondérante.

Découverte dans l'urine humaine en 1771, par ROUELLE le cadet, puis isolée par CRUIHSHANK en 1798, l'urée fut obtenue cristallisée un an plus tard par VAUQUELIN et FOURCROY qui lui donnèrent son nom et qui décrivirent ses propriétés les plus marquantes. A leur suite, de nombreux savants mirent ce composé en évidence dans les tissus et les liquides biologiques, en particulier le sang. Rapidement, ils établirent aussi des liens entre la concentration de l'urée dans l'organisme et l'alimentation en insistant sur l'importance des composés azotés. Ils attribuèrent la fonction d'excrétion de l'urée (mais pas de sécrétion) aux reins (BOUCHARDAT 1869).

En 1828, la synthèse mémorable de l'urée par WOEHLER fut une grande date qui apportait aux chimistes la preuve que les substances carbonées élaborées par les êtres vivants pouvaient également être reproduites artificiellement dans les laboratoires par des moyens purement chimiques : avant cette date, on en était si peu convaincu, que la chimie du carbone avait été appelée chimie organique. nom qu'elle porte encore aujourd'hui.

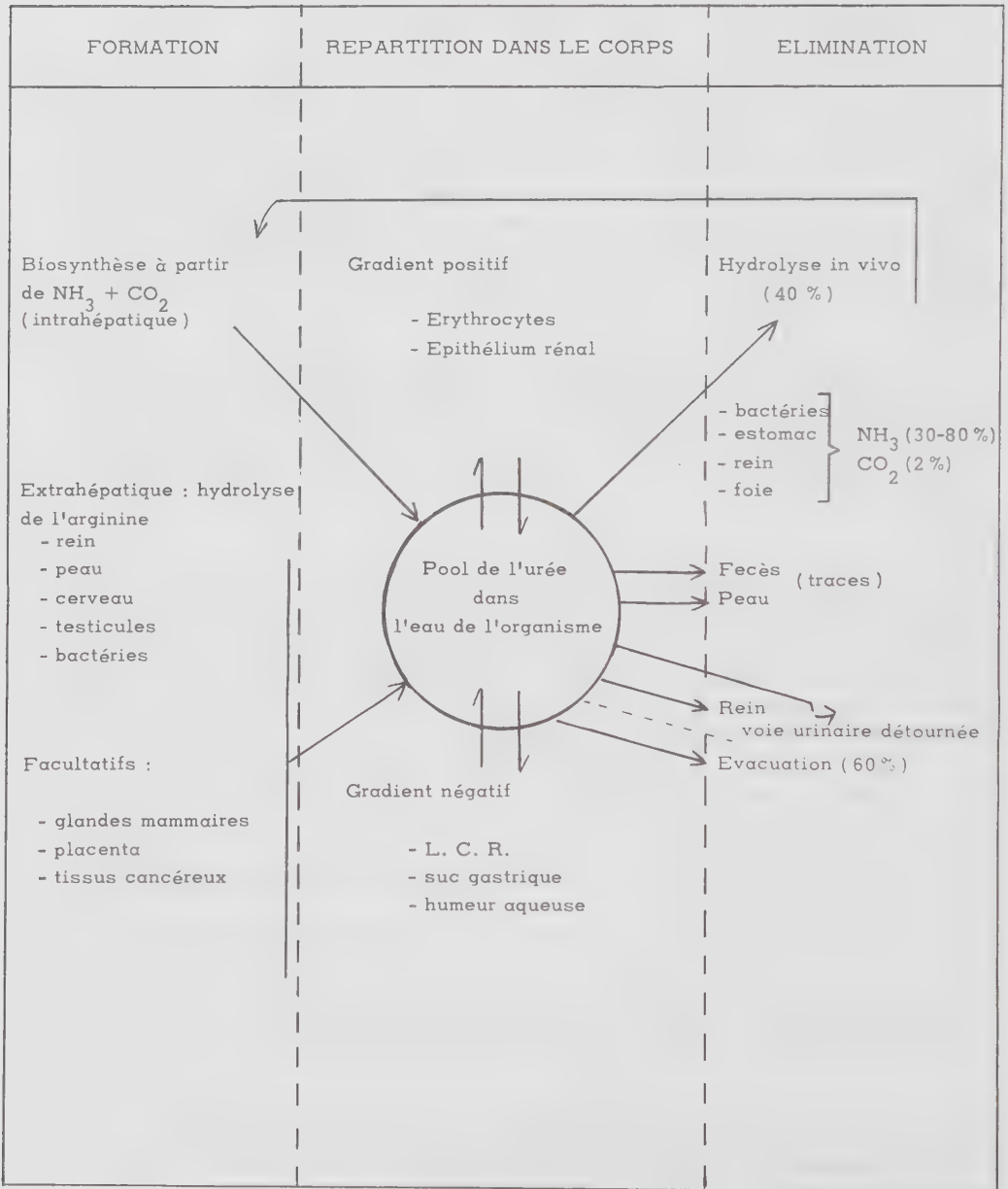
Vers la même époque PREVOST et DUMAS mettent en évidence la concentration élevée de l'urée sanguine au cours des néphropathies mais il faudra encore presque une centaine d'années pour que, avec WIDAL et LAUDAT, au début de la première guerre mondiale, le dosage de l'urée marque le début de la chimie clinique moderne (LECLERC 1965). Les méthodes de dosage de l'urée sanguine avec l'hypobromite, le xanthydrol, l'uréase, la diacétylmonoxime témoigneront de l'évolution de cette partie de la biochimie :

- gain en spécificité, en temps.
- diminution du volume de matériel biologique en passant du millilitre au microlitre.
- hier l'urine, aujourd'hui le sang, demain les cellules et leurs constituants.
- passage à l'automation où l'urée fut encore le premier composé dosé.

La notion de clearance, enfin, a été établie avec l'urée montrant un autre aspect de cette évolution, l'épreuve fonctionnelle des organes se substituant souvent à l'analyse isolée.

L'urée marquera, encore, en 1934, une autre date importante pour les biochimistes. KREBS et HENSELEIT décrivirent le premier cycle des métabolismes intermédiaires, celui qui aboutit à la formation de ce composé.

SCHEMA DU METABOLISME DE L'UREE
(REGOECZI 1965)



L'urée jusqu'à présent ne semblait donc qu'un produit d'excrétion des restes aminés. Cette théorie trop simpliste a fait place à un ensemble plus constructif appelé le pool de l'urée (REGOECZI 1965).

L'utilisation de l'urée comme source d'azote par les bactéries a été à l'origine de ce nouveau schéma métabolique, et il est démontré à l'heure actuelle qu'une partie de l'urée de notre organisme est réutilisée pour la synthèse protéique. Bien plus, l'urée est employée comme additif azoté dans l'alimentation du bétail (KARR et coll. 1965, PACKETT et GROVES 1965, KORNEGAY et coll. 1965). Sera-t-elle l'aliment de l'an 2000 ? Bienfaisante urée qui assurera peut-être l'avenir de l'humanité comme elle en a été à la source.

Oui, l'incroyable urée a certainement été avec les acides aminés un des premiers composés organiques sur cette terre (DUCROCQ 1966).

MILLER, à l'Université de COLOMBIA, il y a une dizaine d'années, entreprit des expériences de simulation de notre jeune planète Terre en reconstituant l'atmosphère terrestre et en la soumettant à un rayonnement ultra-violet.

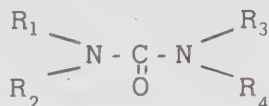
Dans un ballon stérile il enferme de l'hydrogène, du méthane, de l'ammoniac et de la vapeur d'eau. Il opère sous la température de 60° et soumet ce modèle d'atmosphère primitive à des décharges électriques, créant un rayonnement riche en radiations ultra-violettes. Le résultat est sensationnel : la chromatographie permet de révéler une dizaine d'acides aminés, divers autres composés organiques et ... l'urée.

Ce que la vie peut réaliser, ce que le chimiste peut réaliser, la nature put autrefois le réaliser à partir de composés très primitifs, antérieurement à la vie. La synthèse de l'urée en apporte les preuves et donne matière à réflexion et imagination aux scientifiques et aux philosophes.

L'UREE



est le représentant le plus simple d'un ensemble de composés - les dérivés carbamidés - qui répondent à la formule générale



Dans cette classe de composés on trouve des produits naturels comme les acides aminés-N-carbamylés, les bases puriques et pyrimidiques, ou des produits de synthèse.

La chimie pharmaceutique a introduit le radical carbamidé dans de nombreux hypnotiques (barbituriques) des tranquillisants (dérivés de la crotonylurée) des anticonvulsivants (carbénylurée) des hypoglycémiantes (sulfonylurée) et plus récemment des anti-cancéreux (hydroxy et nitrosurée).

Certains dérivés carbamidés existant dans les milieux biologiques sont également utilisés pour leurs propriétés pharmacologiques : acide orotique, carbamylaspartate et urée même. Parmi les propriétés thérapeutiques de l'urée, seule son activité diurétique était autrefois quelque peu utilisée.

Depuis une dizaine d'années, l'urée s'est révélée très précieuse par sa puissante action sur l'œdème cérébral qui est la plus redoutable complication des traumatismes crâniens.

La diminution de la pression du liquide céphalo-rachidien par perfusion de soluté d'urée a été mise en évidence dès 1927 (FREMONT) chez l'animal. Mais ce n'est qu'en 1956 que JAVID a étendu cette application à l'homme. Les doses habituelles chez l'homme sont de 1 g à 1,5 g d'urée par kg de poids corporel.

Le mécanisme exact de l'activité des solutions hypertoniques d'urée n'est pas encore élucidé, quoique probablement en relation avec l'effet diurétique. Différents auteurs (PAPPIUS 1965, LEVY 1965, GREGORY 1965) ont mis en évidence des mouvements des cations et de l'eau entre les compartiments intra et extra-cellulaires sans modifications des constantes de l'appareil circulatoire ; débit cardiaque, pression artérielle ou veineuse, hématocrite, pH et pCO_2 , électrocardiogramme, etc ... (LUND 1965).

Signalons de plus que l'urée modifie la solubilité de certaines substances : tetracyclines, sulfonamides, benzocaïne, quinoxaline, barbituriques (BOLTON 1963), acétaminophen (GOLDBERG 1966), acides benzoïques (ALTWEIN 1965), sels calciques, ce qui pourrait lui valoir une utilisation éventuelle dans certaines lithiases urinaires (COURMEL 1961) ou pour éviter la formation de calculs dentaires (BELTING 1966).

Enfin nous mentionnerons une dernière propriété importante de l'urée : son action dénaturante sur les protéines.

L'urée en solution concentrée modifie les propriétés physico-chimiques des longues chaînes de molécules, en particulier des protéines : en présence de ce composé on a noté des variations de la solubilité des protéines (SELA 1959), de la viscosité de leur solution (STERMAN 1954), du pouvoir rotatoire (SIMPSON 1953), de la biréfringence d'écoulement (FORSTER 1954), de leur comportement à l'ultracentrifugation (HARRINGTON 1959), de la diffraction des rayons X (ECHOLS 1960), de leur résistance à la température (CAVALIERI 1952), de leur potentiel d'oxydo-réduction (BANERJEE 1959), de leur migration dans un champ électrique (SAIFER 1965).

Les modifications de ces propriétés physico-chimiques correspondraient à des phénomènes de gélation (HOSPELHORN 1954), d'aggrégation (HALWER 1954), de déplissement (Mc KENZIE 1955), de libération de certains groupes (GLAZER 1957), d'allongement de la molécule (FORSTER 1956) ou de dépolymérisation (VIGNERON M. 1966), c'est-à-dire à une destruction de l'organisation. La composition chimique n'est pas altérée (VIGNERON M. 1966).

Quoique cette action dénaturante de l'urée et des composés apparentés soit connue depuis longtemps, son mécanisme reste hypothétique : on admet généralement que ces composés dénaturent les protéines en coupant les liaisons hydrogène. Mais des travaux récents ne permettent pas plus d'attribuer cette activité à la formation de complexes (ROBINSON 1965) qu'à une rupture des structures internes (SCHICK 1965). Ces phénomènes engendrés par l'urée sont réversibles lorsque les modifications sont modérées.

Cette activité de l'urée est largement utilisée dans les domaines biologiques :

- modification de l'activité des enzymes (CITRI 1958), des hormones (VISUTAKUL 1965).
- abaissement du pouvoir infectieux des virus (McCREA 1959).
- mutations (HALLUM 1966).
- sensibilisation de certaines réactions antigène-anticorps (BINACHI 1959).
- séparation des isoenzymes (WITHYCOMBE 1964) et des protéines anormales (JIRGERSONS 1954).
- étude de la structure des acides nucléiques (ALEXANDER 1955), des hémoglobines (VIGNERON M. 1966), des enzymes (VIGNERON M. 1966).
- détermination de la pureté de certaines fractions électrophorétiques (SAIFER 1965).
- estimation de la valeur de certaines farines de blé (POMERANZ 1965).
- étude de la fibrinolyse (KUHNKE 1965).

Les dérivés carbamidés ont leur place en biologie végétale. L'urée et d'autres uréides ont été trouvés dans les plantes et même, certaines comme la diphénylurée (SHANTZ 1955) agissent comme kinines, (BRUCE 1965).

Certains dérivés de l'urée sont utilisés comme desherbants ou comme antifongiques (EASTERLY 1965) ; c'est-à-dire pour leur phytotoxicité due à l'inhibition de la photosynthèse (KAMRIN 1965), (IZAWA 1965).

L'urée et le biuret (JENSEN 1965) sont utilisés comme engrais azotés. Les bactéries du sol dégradent ces composés leur évitant d'être phytotoxiques.

OBJET DU TRAVAIL

Pour étudier et doser ces dérivés carbamidés, pour les suivre dans les milieux biologiques, de nombreuses méthodes ont été proposées. En chimie clinique, la technique avec la diacétylmonoxime est une des plus utilisées. Ce n'était pas le cas il y a plusieurs années quand, comme interne, on nous confia une méthode de ce type pour doser l'urée. Les premiers résultats peu reproductibles obtenus nous semblaient nécessiter une étude plus approfondie des caractères de cette réaction colorée.

Mademoiselle BESSON, Professeur de pharmacodynamie, nous accueillit alors dans son laboratoire à la Faculté et guida nos premiers pas dans la recherche.

Aux difficultés techniques rencontrées d'abord, se joignirent celles résultant d'un but que nous nous étions fixé : tenter de réaliser un dosage de l'urée sanguine sans défécation préalable. Ces essais, négatifs pendant longtemps à cause de l'interférence des protéines, nous ont amenés aussi à étudier les réactions colorées existantes et à mettre en évidence des colorations nouvelles.

Nous avons donc dans ce travail poursuivi quatre buts :

1) Améliorer les réactions colorées existantes et faire une étude d'ensemble aussi complète que possible des colorations que donnent l'urée en milieu acide avec des alpha-dicétones et leurs oximes (première partie).

A notre connaissance il n'y a pas de travail où ait été précisée et étudiée simultanément, dans des conditions comparables, l'interférence des acides, des dicétones ou de leurs oximes et des nombreux composés ajoutés dans les mélanges réactionnels.

2) Décrire les colorations nouvelles obtenues avec des dicétones cycliques (deuxième partie). En 1961 et 1963, nous avons signalé des réactions colorées des dérivés carbamidés mettant en jeu :

- . la cycloheptanedionedioxime ou heptoxime.
- . la cyclohexanedione.
- . la cyclohexanedionedioxime ou nioxime.

3) Apporter notre contribution à la définition de la nature des complexes colorés formés (troisième partie). L'étude de la réactivité des dicétones et des dérivés carbamidés permet un choix entre certaines hypothèses présentées. La méthode des variations continues précise les rapports les plus favorables entre les molécules en présence.

4) Appliquer les résultats obtenus aux milieux biologiques (quatrième

partie). Dans ces milieux, les réactions colorées étudiées permettent la mise en évidence et le dosage de composés qui s'y trouvent naturellement comme l'urée, la citrulline, l'allantoïne, les acides N-carbamylés. Après transformation, les dérivés puriques et pyrimidiques (acide urique, acide orotique) peuvent donner également des colorations.

Enfin nous pourrons aussi étudier des systèmes enzymatiques mettant en jeu de tels composés (ornithine carbamyltransférase, arginase).

Le plan de travail qui suit correspond aux buts que nous nous étions fixés.

PLAN DU TRAVAIL

Introduction générale

Première partie : Etude des réactions colorées des dérivés carbamidés avec le diacétyl, la phénylpropanedione et leurs oximes.

Historique. - Tableau synoptique des techniques existantes.

Chapitre premier. - Etude des acides dans la réaction urée-diacétylmonoxime.

Chapitre deuxième. - Etude de la diacétylmonoxime, réactif de l'urée.

Chapitre troisième. - Etude des composés interférant dans la réaction urée-diacétylmonoxime.

A) Composés oxydants et réducteurs.

B) Sels métalliques.

C) Solvants organiques.

D) Divers adjuvants.

Chapitre quatrième. - Etude de la réaction colorée urée-diacétyl.

Chapitre cinquième. - Etude de la réaction colorée urée-diacétyldioxime.

Chapitre sixième. - Etude des réactions colorées avec la phénylpropanedione et ses oximes.

Chapitre septième. - Etude de la photosensibilité et de la photostabilité des réactions colorées.

Deuxième partie : Nouvelles réactions colorées des dérivés carbamidés avec des dicétones cyclaniques.

Chapitre premier. - Etude de la réaction urée-heptoxime.

Chapitre deuxième. - Etude de la réaction urée-cyclohexanedione.

Chapitre troisième. - Etude de la réaction urée-nioxime.

Troisième partie : Hypothèses sur la nature des complexes colorés.

Chapitre premier. - Etude des dicétones.

Chapitre deuxième. - Etude des réactions colorées de dérivés substitués de l'urée.

Chapitre troisième. - Etude par la méthode des variations continues de Job.

Quatrième partie : Applications biologiques.

I. - Le dosage de l'urée.

A) Dosages de l'urée après défécation.

- par la diacétylmonoxime en milieu arsénicosulfurique.

- par la diacétylmonoxime en milieu phosphoferrique.

- par la phénylpropanedionemonoxime.

- par l'heptoxime.

B) Dosage de l'urée par la diacétylmonoxime sans défécation préalable.

C) Dosage de l'urée urinaire par la nioxime.

II. - Le dosage de la citrulline.

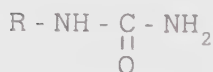
III. - Réactivité des dérivés pyrimidiques et puriques et de leurs produits d'hydrolyse.

Conclusions générales

PREMIERE PARTIE

ETUDE DES REACTIONS COLOREES DES DERIVES CARBAMIDES AVEC LE DIACETYLE, LA PHENYLPROPANEDIONE ET LEURS OXIMES

Les dérivés carbamidés réagissent en milieu acide avec des alphadicétones en donnant des complexes colorés jaunes ou rouges. La réaction est analogue à celle des dérivés guanidiques en milieu alcalin.



dérivé carbamidé



dérivé guanidique



alpha-dicétones

La plupart des réactions dicétones-dérivés carbamidés découlent des réactions dicétones-dérivés guanidiques. En effet, ces réactions colorées ont d'abord eu pour but la recherche et le dosage d'une dicétone biologique, le diacétyle, puis elles ont servi à doser les composés guanidiques et carbamidés.

On trouve l'origine de ces réactions dans l'observation suivante : VOGES et PROSKAUER (1898) avaient remarqué que l'addition de potasse à la culture de certaines bactéries développait une coloration rose fluorescente, plus intense en surface.

HARDEN (1905) montra que cette réaction était due à la présence, dans le milieu, d'acétylméthylcarbinol.



et de son produit d'oxydation, le diacétyle



L'eau peptonée se révélait nécessaire, en plus de la potasse, au développement de la coloration. L'explication était donnée, en 1911, par HARDEN et NORRIS qui montrèrent que les protéines de l'eau peptonée et plus particulièrement l'arginine, dérivé guanidique, étaient responsables de la réaction colorée avec le diacétyle en milieu alcalin. Ces auteurs vérifièrent la réactivité de toute une série de composés guanidiques, en particulier de la créatine. Celle-ci donnant une réaction très intense avec le diacétyle, fut ajoutée par O' MEARA (1931) pour sensibiliser la réaction de VOGES et PROSKAUER. BARRIT (1936), par addition d'alpha-naphtol, améliora encore très nettement la réaction en la sensibilisant une nouvelle fois.

Certains auteurs appliquèrent la réaction précédente à l'étude, dans les milieux biologiques, des dérivés guanidiques, en particulier créatine et arginine. WALPOLE (1911), EGGLETON (1928) et DULIERE (1929) l'utilisèrent pour l'estimation de la créatine dans l'urine et le muscle.

Mais ce n'est qu'avec l'utilisation de l'alpha-naphtol que des techniques valables de dosage furent mises au point. Le diacétyl en présence d'alpha-naphtol est encore aujourd'hui, un réactif très utilisé des groupements guanidiques (ROOS 1965).

Une autre alpha-dicétone, la phénylpropanedione



a été proposée en 1929 par DULIERE pour remplacer le diacétyl. Elle a été utilisée par LANG en 1932 pour doser la créatine.

En 1935, MULLER reprenant les travaux de LANG, fit quelques essais rapides avec l'urée et la phénylpropanedione. Il isole un produit cristallisé de condensation qu'il soumet à l'action de l'acide sulfurique concentré et obtient une coloration rouge. Il faut rapprocher de cette observation les travaux, de FRANCHIMONT et KLOBBIE qui en 1888 avaient obtenu une coloration jaune par action de l'acide nitrique sur le produit de cristallisation de l'urée et du diacétyl. SMITH (1935) étudia les réactions colorées des carbazides avec le diacétyl et sa dioxime, réactions développées en milieu chlorhydrique.

C'est à FEARON (1939) que revint le mérite d'avoir appliqué la réaction aux dérivés carbamidés des milieux biologiques. Il décrit les réactions colorées de la citrulline et de l'urée, uniquement du point de vue qualitatif. Il utilisa le premier la diacétylmonoxime, le chauffage au bain-marie-bouillant et l'intensification par le persulfate de potassium ajouté après le chauffage. ABELIN (1940) en fit une réaction semi-quantitative pour l'urée sanguine, réaction très simple, utilisant comme seule acidité, celle apportée par le réactif de défécation, l'acide trichloracétique.

GORNALL et HUNTER (1941) reprirent le travail de FEARON sur la citrulline pour rendre la réaction quantitative : ils définirent le temps de chauffage et firent déjà remarquer la nécessité d'une standardisation très poussée.

ORMSBY (1942) de même, étudia la réaction de l'urée en milieu chlorhydrique, avec addition de persulfate, et un mode opératoire très strict pour tenir compte de la cinétique de la réaction.

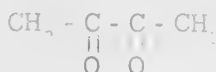
ARCHIBALD en 1944 et 1945 fit une étude très approfondie d'abord de la réaction citrulline-diacétylmonoxime puis de la réaction urée-phénylpropanedionemonoxime. Nous remarquons qu'à l'exemple de FEARON qui préféra la monoxime au diacétyl parce que cristallisée et plus stable, ARCHIBALD (1945) s'adressa pour doser l'urée en milieu acide à la monoxime de la phénylpropanedione que DULIERE, LANG et MULLER avaient utilisée en milieu alcalin. Il décrit les colorations de toute une série de dérivés carbamidés avec

les deux dicétones. Il remplaça l'acide chlorhydrique par un mélange sulfurique-phosphorique évitant l'addition d'oxydants. Ces deux techniques sont encore utilisées aujourd'hui.

Nous avons retrouvé plus d'une centaine d'améliorations successives de méthodes révélant ou dosant des dérivés carbamidés :

- soit par le diacétyle et ses oximes, la diacétylmonoxime et la diacétyldioxime :

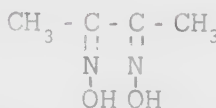
Le diacétyle



La diacétylmonoxime



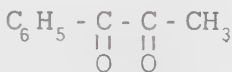
La diacétyldioxime



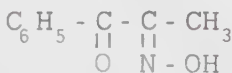
qui réagissent avec l'urée pour donner une coloration jaune ayant un maximum d'absorption à 475-480 nm.

- soit par la phénylpropanedione et sa monoxime

La phénylpropanedione



La phénylpropanedione-monoxime



qui donnent en milieu acide, une coloration rouge violette ayant un maximum d'absorption à 540 nm.

Nous avons regroupé dans un tableau synoptique, par ordre historique, les réactions colorées ou les techniques de dosage des dérivés carbamidés avec des dicétones. Nous y avons fait figurer en détail la composition des réactifs, les quantités utilisées et le volume total dans lequel se développent les colorations.

TABLEAU SYNOPTIQUE DES TRAVAUX ETUDIANT OU DECRIVANT DES REACTIONS AVEC LES DICETONES EN MILIEU ACIDE

	Dicétone ou oxime utilisée	Composé étudié ou dosé	Milieu acide	Autres composés introduits dans la réaction	Volume total du mélange réactionnel	Temps de chauffage	Particularités
FRANCHMONT et KLOBBE (1888)	Diacétyl ou glyoxal	Urée et dérivés	NO_3H			Nul	Coloration jaune
MULLER (1935)	Phénylpropanedione	Urée	SO_4H_2			dû au mélange acide-eau	Coloration rouge
SMITH (1935)	Diacétyldioxime et diacétyl	Carbazines et carbamides	ClH			Nul	Coloration jaune
PIEN et coll. (1936)	Diacétyl	Métoparatalu- nedamine 1 p. 100 0, 5 ml	SO_4H_2 10 ml		20, 5 ml	dû au mélange acide-eau	Coloration jaune
PIEN et coll. (1937)	Diacétyl	Diaminobenzidine 2,5 p. 100 0, 5 ml	ClH 0, 5 ml		11 ml	Nul	Coloration jaune
FEARON (1939)	Diacétylmonoxi- me (qq gouttes)	Citrulline (urée)	ClH	Persulfate		Bain-marie bouil- lant 3-4 minutes	Réaction qualitative
ABELIN (1940)	Diacétylmonoxi- me 5 p. 100 0, 2 ml	Urée	$\text{CCl}_3\text{-COOH}$ 2 ml		2, 2 ml	Bain-marie bouil- lant 5 minutes	Réaction semi-quantitative
GORNALL et HUNTER (1941)	Diacétylmonoxi- me 3 p. 100 0, 5 ml	Citrulline	ClH 4 ml	Persulfate de potassium 1 p. 100 (1 goutte)	11, 5 ml	Bain-marie bouil- lant 9 minutes	
ORMSBY (1942)	Diacétylmonoxi- me 3 p. 100 0, 5 ml	Urée	ClH 5 ml	Persulfate de potassium 1 p. 100	8, 5 ml	Bain-marie bouil- lant 10 minutes	
ARCHIBALD (1944)	Diacétylmonoxi- me 3 p. 100 0, 25 ml	Citrulline	Mélange $\text{PO}_4\text{H}_3\text{-}$ SO_4H_2 (3/1) 2 ml		6, 25 ml	Bain-marie bouil- lant 10 minutes	
BARKER (1944)	Diacétylmonoxi- me 3 p. 100 0, 25 ml	Urée	SO_4H_2 50 p. 100 4 ml	Persulfate de potassium 1 p. 100 0, 25 ml	6, 5 ml	Bain-marie bouil- lant 10 minutes	
ARCHIBALD (1945)	Phénylpropanedione-2-oxime 4 p. 100 dans éthanol 0, 4 ml	Urée	Mélange $\text{PO}_4\text{H}_3\text{-}$ SO_4H_2 (3/1) 5 ml		12, 4 ml	Bain-marie bouil- lant 60 minutes	Coloration violette
KAWERAU (1946)	Diacétylmonoxi- me 1 p. 100 dans acide acé- tique 5 p. 100 2 ml	Urée (citrulline allantoinine) ou Mélange $\text{SO}_4\text{H}_2\text{-}$ PO_4H_3 (1/3) 3 ml AsO_4H_3 10 p. 100 dans SO_4H_2 50 p. 100 3 ml	AsO_4H_3 10 p. 100 dans ClH concentré 4 ml		9 ml	Bain-marie bouil- lant 20 minutes pour urée 15 minutes pour citrulline	
WHITE et coll. (1946)	Diacétyl (com- posé à doser)	Urée 3 p. 100 1 ml	Mélange $\text{PO}_4\text{H}_3\text{-}$ SO_4H_2 (3/1) 2 ml	Hydroxylamine chlorhydrate 1 p. 100 1 ml	6 ml	Bain-marie bouil- lant 35 minutes	Dosage du diacétyl
FOLLEY et GREENBAUM (1948)		Méthode d'ARCHIBALD (1945)		Interférence de Ma et de l'arginine			Mesure de l'arginase
WHEATLEY (1948)	Diacétylmonoxi- me 3 p. 100 0, 25 ml	Urée	SO_4H_2 50 p. 100 4 ml	Acide phénylalan- thramique 0,005M 0, 25 ml Persulfate de po- tassium 1 p. 100 0, 25 ml	6, 5 ml	Bain-marie bouil- lant 10 minutes puis persulfate	Coloration rouge orangée

	Dicétone ou oxime utilisée	Composé étudié ou dosé	Milieu acide	Autres composés introduits dans la réaction	Volume total du mélange réactionnel	Temps de chauffage	Particularités
OREKHOVIC et TUSTANOVSKI J (1949)	Diacétylmonoxime 5 p. 100 (2 gouttes)	Urée et citrulline	PO_4H_3 contenant 1 ml de nitrite de sodium a 0,18 p. 100 pour 100 ml d'acide 0,6 ml puis 4,1 ml après Bain-marie bouillant	Tryptophane M° 500 et M° 2000 0,035 ml (1 goutte) Nitrite de sodium a 0,18 p. 100 1 goutte plus 1 goutte après Bain-marie bouillant	6,1 ml	Bain-marie bouillant 5 minutes	Coloration pourpre si rapport entre urée et tryptophane sont optima
WINGO et DAVIS (1949)		Techniques d'ARCHIBALD (1944) pour la citrulline		Interférence des protéines et de leurs hydrolysis			
HALVORSON et SCHULTZE (1950)		Technique d'ARCHIBALD (1945) pour l'urée		Interférence de substances "chromogènes" chez le rat			
NATELSON et coll. (1951)	Diacétyle 5 p. 100 dans éthanol 1 partie extemporanément dans 25 parties de reactif acide 1 ml	Urée	Mélange SO_4H_2 - PO_4H_3 - eau (1/3/4)		2 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes	
JANCIC (1952)	Diacétyldioxime 0,5 p. 100 dans ClH 7 ml	Uree	ClH	Persulfate de potassium 0,5 p. 100 après refroidissement	8,5 ml	Bain-marie bouillant 80 minutes	
MURAYAMA (1952)	Phénylpropanedione-2-oxime 4 p. 100 dans éthanol 0,5 ml	Urée	Mélange SO_4H_2 - PO_4H_3 - eau (1/3/1) 4 ml		7,5 ml	autoclave 1 atm 30 minutes	
FRIEDMANN (1953)	Diacétylmonoxime 1 p. 100 dans acétique 5 p. 100 0,5 ml	Urée	AsO_4H_3 10 p. 100 dans SO_4H_2 50 p. 100 1 ml		2,5 ml plus 7,5 ml après Bain-marie bouillant	Bain-marie bouillant 10 minutes Ajouter 7,5 ml d'eau distillée	
ELÓDI (1954)	Diacétylmonoxime 3 p. 100 0,15 ml	Uree et citrulline	Mélange PO_4H_3 - SO_4H_2 (3/1) 1 ml	Phénylhydrazine chlorhydrate 14,5 mg p. 100 0,15 ml	2,30 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes	Dosage simultané de l'urée et de la citrulline Coloration jaune avec l'urée et rouge avec la citrulline
JACKSON (1954)	Diacétylmonoxime 1 p. 100 dans acétique 5 p. 100 2 ml	Viomycine	PO_4H_3 - SO_4H_2 (3/1) 3 ml		9 ml	Bain-marie bouillant 150 minutes	
DICKENMANN et coll. (1954)	Phénylpropanedione et diacétyle 0,2 ml p. 100 de reactif acide 3 ml	Urée	PO_4H_3 dilué (80 p. 100)		6 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes (15 minutes pour faibles urées)	
PECHAR et coll. (1954)				Tryptophane			
KORITZ et COHEN (1954)	Diacétylmonoxime 3 p. 100 0,25 ml	Carbamylaminoacides	SO_4H_2 50 p. 100 6 ml	Diphénylaminopararsulfonate de sodium 1 p. 100 0,1 ml Persulfate de potassium 1 p. 100 0,25 ml	9,6 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes Ajouter persulfate après refroidissement. Remettre 1 minute au Bain-marie bouillant	Coloration violette

	Dicétone ou oxime utilisée	Composé étudié ou dosé	Milieu acide	Autres composés introduits dans la réaction	Volume total du mélange réactionnel	Temps de chauffage	Particularités
CARAWAY et FANGER (1955)	Diacétyle redistillé 0,2 ml dans 100 ml de réactif acide 100 μ l	Urée	Mélange SO_4H_2 - PO_4H_3 - eau (1/3/4)		200 μ l	Bain-marie bouillant 10 minutes	Microméthode
GRISOLIA (1955)	Diacétylmonoxime 3 p. 100 0, 25 ml	Citrulline	Mélange PO_4H_3 - SO_4H_2 (1/3) 2 ml		7, 25 ml	Bain-marie bouillant 15 minutes	Dosage de l'ornithine carbamyl-transférase
PERROT (1955)	Diacétylmonoxime 1,5 p. 100 0, 5 ml	Urée	PO_4H_3 officinal 50 p. 100 6 ml	Persulfate de potassium 0,5 p. 100 0, 5 ml	10 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes Refroidir puis persulfate	
RATNER (1955)	Phénylpropanedionemoxime 3g p. 100 0, 5 ml	Urée	SO_4H_2 90 ml PO_4H_3 270 ml Eau 440 ml 10 ml		11 ml	Bain-marie bouillant 60 minutes	
RATNER (1955)	Diacétylmonoxime 0,75 p. 100 1 ml	Citrulline	SO_4H_2 25 ml PO_4H_3 75 ml Eau 150 ml 5 ml	Traces de cuivre interfèrent	6, 1 ml	Bain-marie bouillant 15 minutes	
ROSENTHAL (1955)	Diacétylmonoxime 2,5 p. 100 ds acide acétique 5 p. 100 1 ml	Urée	AsO_4H_3 0,26 N dans ClH 3,8 N 3 ml		10 ml		
BRONK et FISCHER (1956)		Méthode de GORNALL et HUNTER pour la citrulline					
CARAWAY et FANGER (1956)	Diacétylmonoxime 1 p. 100 dans acide acétique 5 p. 100 50 μ l	Urée	AsO_4H_3 10 p. 100 dans SO_4H_2 50 p. 100 100 μ l		250 μ l	Bain-marie bouillant 10 minutes	Microméthode
KIDO (1957)	Diacétylmonoxime 3 p. 100 ds ClH	Dérivés carbamidés provenant de l'oxydation des bases puriques et pyrimidiques par l'eau oxygénée	ClH	Thiosemicarbazide 1 p. 100 ds éthanol		Bain-marie bouillant 5 minutes	Coloration rouge pourpre
KNIGHTS (1957)		Méthode de FRIEDMANN adaptée en microméthode					
LECLERC et SCHWARTZ (1957)		Technique de DICKENMAN et Coll. (1954) Etude de la photosensibilité					
LE MAR et BOOTZIN (1957)	Diacétyle 5 p. 100 dans alcool Diluer 1 ml dans 100 ml de réactif acide 5 ml	Urée dans produits corrosifs	Mélange SO_4H_2 - PO_4H_3 - eau (1/3/4)		10 ml	Bain-marie bouillant 20 minutes	Dosage d'urée non biologique
MANNING et GRISOLIA (1957)	Phénylpropanedionemoxime 4 p. 100 ds éthanol 0, 4 ml	Urée	Mélange SO_4H_2 - PO_4H_3 (3/1) 2 ml		7, 4 ml	Bain-marie bouillant 60 minutes	Mesure de l'engraisse
MARSH et coll. (1957)	Diacétylmonoxime 0,25 p. 100 dans ClNa 15 p. 100	Urée	AsO_4H_3 10 p. 100 dans SO_4H_2 50 p. 100			Bain-marie bouillant 3 minutes environ	Méthode automatique
SKEGGS (1957)	Diacétylmonoxime 0,5 p. 100 ds ClNa 15 p. 100	Urée	AsO_4H_3 10 p. 100 dans SO_4H_2 50 p. 100			Bain-marie 95°	Méthode automatique
VELAY (1957)	Diacétylmonoxime 1,5 p. 100 0, 5 ml (Phénylpropanedione-2-oxime Méthode d'Archibald)	Urée	PO_4H_3 50 p. 100 6 ml	Persulfate de potassium 1 p. 100 0, 5 ml	10 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes	

	Dicétone ou oxime utilisée	Composé étudié ou dose	Milieu acide	Autres composés introduits dans la réaction	Volume total du mélange réactionnel	Temps de chauffage	Particulaires
CROKAERT et SCHRAM (1958)	Diacétylmonoxime 0,75 p. 100 1 ml	N-carbamoyl-derivés d'acides aminés et urée	SO ₄ H ₂ 66 p. 100 3 ml	Acide diphenylsulfonique 0,1 p. 100 ds ClH 0,1 N 1 ml Persulfate de potassium 0,25 p. 100 1 ml après refroidissement	7 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes	Coloration violette (λ = 545 nm pour l'urée)
GARGIA CANTURRI (1958)	Diacétylmonoxime 3 p. 100 0, 5 ml	Urée	ClH 5 ml	Persulfate de potassium 1 p. 100 0, 25 ml après refroidissement	8, 75 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes	
GIRARD et DREUX (1958 et 1959)	Diacétylmonoxime 3 p. 100 0, 5 ml	Urée	SO ₄ H ₂ 50 p. 100 2 ml	Chloramine T 0,5 p. 1000 0, 5 ml de suite après bain-marie bouillant	4 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes	
IUCHI (1958)	Diacétylmonoxime 1 p. 100 ds acide acétique 5 p. 100 1 ml	Urée	ClO ₄ H 60 p. 100 1 volume ClH conc. 4 volumes 1, 5 ml		3, 5 ml	non défini	
PEARL et coll. (1958)		Technique d'Archibald (1944) pour la citrulline					
SARDOU (1958)	Diacétylmonoxime 1 p. 100 ds acide acétique 5 p. 100 0, 5 ml	Urée	As ₂ O ₃ H ₂ 10 p. 100 dans SO ₄ H ₂ 50 p. 100 1 ml		2, 5 ml	Bain-marie bouillant 5 minutes	
WEARNE (1958)		Technique de ROSENTHAL (1955) mais chauffage à l'autoclave 10 minutes					
WILKINSON et HARVEY (1958)	Diacétylmonoxime 2 p. 100 acide acétique 2 p. 100 0, 25 ml	Urée	Mélange PO ₄ H ₃ -SO ₄ H ₂ - eau (3/1/3) 0, 5 ml		1, 25 ml	non défini	Utilisation de solution de chlorure ferrique comme gamme de comparaison
ANDERSEN et STRANGE (1959)	Diacétylmonoxime 0,5 p. 100 acide acétique 2,5 p. 100 2 ml	Urée	As ₂ O ₃ H ₂ 55g dans SO ₄ H ₂ 50 p. 100 2 ml		5 ml	Bain-marie bouillant 15 minutes	
BROWN et GRISOLIA (1959)		Technique de Grisolia (1955)					
HOLDEN (1959)	Diacétylmonoxime 1 p. 100	Urée	Mélange diacétylmonoxime-PO ₄ H ₃ (1/4) 1 ml		1, 5 ml	Bain-marie bouillant 60 minutes	
KITAMURA et IUCHI (1959)	Diacétylmonoxime 1 p. 100 ds acide acétique 5 p. 100 1 ml	Urée	SO ₄ H ₂ 60 ml eau 240 ml ClO ₄ H (70 p. 100) 22 ml 4 ml		6 ml	Bain-marie bouillant 30 minutes	
RICHTER et LAPOINTE (1959)	Diacétylmonoxime 0, 5 p. 100 ds ClNa 15 p. 100 8, 5 ml	Urée	As ₂ O ₃ 22,6g Eau dist. 110 ml SO ₄ H ₂ 177 g 8, 5 ml		27, 5 ml	Bain-marie bouillant 20 minutes avec refroidissement	Méthode manuelle correspondant à méthode automatique
BALDI (1960)	Diacétylmonoxime 1 p. 100 ds acide acétique 5 p. 100 0, 5 ml	Urée	As ₂ O ₃ H ₂ 10 p. 100 ds SO ₄ H ₂ 50 p. 100 1 ml		2, 5 ml	Bain-marie bouillant 5 minutes	
BANCHI et LOMUTO (1960)	Diacétyldioxime 3 p. 100 dans ClH concentré	Acide orotique après oxydation	ClH	Thiosemicarbazide (1 p. 100 alcool 70 p. 100)			Réaction qualitative des bases puriques et pyrimidiques
DURIEUX, BROUON et HEUSGHEM (1960)		Méthode automatique de MARSH et coll. (1957)					

	Dicétone ou oxime utilisée	Composé étudié ou dosé	Milieu acide	Autres composés introduits dans la réaction	Volume total du mélange réactionnel	Temps de chauffage	Particulantes
FAUVERT et HARTMANN (1960)	Diacétylmonoxime 1 p. 100 dans acide acétique 5 p. 100 0, 5 ml	Urée	SO ₄ H ₂ 60 ml Eau 240 ml ClO ₄ H (70 p. 100) 22 ml 2 ml	Chloramine T 0, 5 p. 1000 0, 5 ml de suite après le chauffage	4 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes	
FORSELL et PALVA (1960)	Diacétylmonoxime 2, 5 p. 100 0, 5 ml	Urée	AsO ₄ H ₃ 0, 26 N dans ClH 1, 5 ml		5 ml	Autoclave 15 minutes à deux atmosphères	
MISTRY et GRILLO (1960)		Méthodes d'ARCHIBALD (1944) et de KORITZ et COHEN (1951)					
MOCKLER et coll. (1960)	Diacétylmonoxime 3 p. 100 0, 3 ml	Citrulline	SO ₄ H ₂ -PO ₄ H ₃ (1/3) 2 ml	Phénylhydrazine chlorhydrate 14, 5 mg p. 100 0, 3 ml	8, 6 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes	
SIEST (1960)		Méthode de Friedmann (1953)					
BEALE et CROFT (1961)	Diacétylmonoxime 1 p. 100 dans acide acétique 0, 02 p. 100 0, 3 ml	Urée	Mélange complexe à base acide sulfurique et très peu d'acide chlorhydrique 5 ml	Acide phényl-am-thranilique, Phosphate monosodique, Manganèse, Nitrate	6, 2 ml	Bain-marie bouillant 11-12 minutes	Reactif très complexe
FAUVERT et HARTMANN (1961)	Diacétylmonoxime 1 p. 100 dans acide acétique 5 p. 100 0, 5 ml	Urée	AsO ₄ H ₃ 10 g Eau 100 ml SO ₄ H ₂ 50 ml 1, 5 ml		3 ml	Bain-marie bouillant 30 minutes	
NOVAK (1961)	Diacétylmonoxime 1 p. 100 dans acide acétique 5 p. 100 0, 1 ml	Uree	AsO ₄ H ₃ 10 p. 100 dans SO ₄ H ₂ 50 p. 100 0, 2 ml		0, 5 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes	Microméthode
SIEST (1961)	Phénylpropandione-2-oxime	Urée	AsO ₄ H ₃ 10 p. 100 dans PO ₄ H ₃ 75 p. 100	Protéines	4, 3 ml	Bain-marie bouillant 30 minutes. Ajouter 6 ml d'eau après refroidissement	
SIEST (1961)	Heptoxime (cycloheptanedione-dioxime) 0, 4 p. 100 1 ml	Uree	AsO ₄ H ₃ 25 g p. 100 dans SO ₄ H ₂ 50 p. 100 4 ml		6 ml	Bain-marie bouillant 30 minutes	Coloration jaune photo stable
DEVAUX (1962)		Méthode de Wheatley (1949)					
GERHART et PARDEE (1962)	Diacétylmonoxime 2, 25 p. 100 0, 5 ml	Carbamylaspartate	SO ₄ H ₂ 66 p. 100 1, 5 ml	Diphénylamine persulfonate de sodium 0, 114 g p. 100 ml ClH 0, 1 N contenant 0, 5 ml Persulfate de potassium 0, 25 p. 100 0, 5 ml après refroidissement	3 ml	Bain-marie 60° 30 minutes	
GLASMACHER et PODZUS (1962)		Méthode de Friedmann (1953) adaptée en microméthode					
LECLERC (1962)		Généralités sur les réactions avec les dicétones alpha					
LECQ (1962)		Méthode de Fauvert et Hartmann (1960)					
LINTON et CAMPBELL (1962)	Diacétylmonoxime	Citrulline		SO ₄ Cu dans le reactif acide			Dosage de l'arnithine carbamyltransférase
O' BRIEN et IBOTT (1962)	Diacétylmonoxime 1 p. 100 dans acide acétique 5 p. 100 20 µ l	Uree	AsO ₄ H ₃ 10 p. 100 dans SO ₄ H ₂ 50 p. 100 40 µ l		260 µ l	Bain-marie bouillant 20 minutes	Microméthode

	Dicétone ou oxime utilisée	Composé étudié ou dose	Milieu acide	Autres composés introduits dans la réaction	Volume tot. du mélange réactionnel	Temps de chauffage	Particularités
RICHTER et LAPOINTE (1962)	Diacétylmonoxime 0,5 p. 100 ds ClNa 15 p. 100 8, 5 ml	Urée	alun de fer 5 g eau dist. 500 ml PO ₄ H ₃ 500 ml SO ₄ H ₂ 500 ml 8, 5 ml	Fe dans réactif acide	17, 5 ml	Bain-marie bouillant 15 minutes refroidi de suite	Méthode manuelle correspondante à méthode automatique
TIMMERMANS (1962)	Phénylpropane-diosemoxime 3 p. 100 ds ethanol 0, 5 ml	Urée	ClH 18 p. 100 10 ml	edestine + phosphate	10, 7 ml	Bain-marie bouillant 20 minutes	Utilisation des protéines
BASTIDE et coll. (1963)		Méthode de BROWN et GRISOLIA (1960)					Mesure de l'omithine carbamyltransférase
CERIOTTI et SPANDRIO (1963)	Diacétylmonoxime 0,5 p. 100 ds acide acétique 5 p. 100 1 ml	Urée	SO ₄ H ₂ 40 p. 180 4 ml	Phénozone 0,4 p. 100 dans le réactif acide	10 ml	Bain-marie bouillant 50 minutes	Coloration jaune citron
COULOMBE et FAVREAU (1963)	Diacétylmonoxime 0,6 p. 100	Urée	PO ₄ H ₃ 60 p. 100 10 parties + réactif diacétylmonoxime thiosemicarbazide 2 parties 5 ml	Thiosemicarbazide 0,03 p. 100 dans le réactif et la diacétylmonoxime	5, 2 ml	Bain-marie bouillant 20 minutes	Coloration rose (Maximum = 55 nm)
DAVIDSON et WINTER (1963)	Diacétylmonoxime 0,5 p. 100 ds ClNa 15 p. 100	Hydroxyurée	Réactif de Richter et Lapointe	p. diphenylaminosulfonate		Bain-marie 95°	Méthode adaptée à l'autoanalyseur
KULHANEK et coll. (1963)	Diacétyldioxime 1 p. 100 dans ethanol	Citrulline	ClO ₄ H 60 p. 100 0, 4 ml PO ₄ H ₃ -SO ₄ H ₂ (1/3) 0, 4 ml		3 ml	Bain-marie bouillant 15 minutes	Dosage de l'omithine carbamyltransférase
MANOVA et coll. (1963)	Diacétylmonoxime 1 p. 100 ds acide acétique 5 p. 100 0, 10 ml	Urée	AsO ₄ H ₂ 13,8 g dans SO ₄ H ₂ 49 p. 100 100 ml 0, 20 ml		0, 8 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes	Microméthode avec déprotéinisation sur papier
SIEST (1963)	Cyclohexanedione M/20 et M/50 2 ml	Urée	PO ₄ H ₃ 4 ml		8 ml	Bain-marie 37° ou 45°	Coloration violette
SIEST (1963)	Nioxime (cyclohexanedione-dioxime) M/50 2 ml	Urée	PO ₄ H ₃ pur 4 ml		8 ml	Bain-marie 45° 30 minutes	Coloration violette
CAVICCHINI et coll. (1964)	Diacétylmonoxime 3 p. 100 0, 5 ml	Citrulline	ClH 4 ml	Persulfate de potassium 1 p. 100 après bain-marie bouillant 1 goutte	11, 5 ml	Bain-marie bouillant 9 minutes	
HENRY (1964)		Etude critique rapide des techniques existantes utilisant des dicétones ou leurs oximes					
HYCEL (1964)	Diacétylmonoxime 0,075 p. 100 ds réactif acide	Urée	As ₂ O ₃ 0,7 p. 100 dans SO ₄ H ₂ 12 p. 100 4 ml		4, 5 ml	Bain-marie bouillant 12 minutes	
KULHANEK et coll. (1964)	Diacétyldioxime 1 p. 100 dans ethanol 0, 25 ml	Citrulline	SO ₄ H ₂ 77, 5 ml PO ₄ H ₃ 12, 5 ml eau q.s.p. 250 ml	Phénozone 4 g p. 250 ml de réactif acide 2, 5 ml	3 ml	Bain-marie bouillant 20 minutes	Dosage de l'omithine carbamyltransférase
LE LUAN (1964)	Diacétylmonoxime 3 g p. 100 ml 0, 3 ml	Citrulline	SO ₄ H ₂ 1 p. 100 PO ₄ H ₃ 3 p. 100 2 ml	Phénylhydrazine 14, 5 mg p. 100 0, 3 ml	8, 6 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes	Mesure de l'omithine carbamyltransférase

	Diacétone ou oxime utilisée	Composé étudié ou dosé	Milieu acide	Autres composés introduits dans la réaction	Volume total du mélange réactionnel	Temps de chauffage	Particularités
Mc CLESKEY (1964)	Diacétylmonoxime 0,5 p. 100 ds ClNa 15 p. 100 2 ml	Urée	SO ₄ H ₂ 0, 3 ml		4, 3 ml	Bain-marie bouillant 15 minutes	Mesure fluorimétrique
PELLERIN (1964)		Méthode de Coulombe et Favreau adaptée à l'autoanalyseur					
WOOTON (1964)	Diacétylmonoxime 0,5 g p. 100 avec ClNa	Urée	PO ₄ H ₃ 600 ml Eau 400 ml NO ₃ H 10 ml				Méthode automatique
BERAN et BERKA (1965)	Diacétylmonoxime 2,5 p. 100 ds acide acétique 5 p. 100 1 ml	Urée	PO ₄ H ₃ -HCl (1/19) 3 ml		10 ml	Bain-marie bouillant 30 minutes	Dosage de l'urée dans les lessives de soude
BROWN et BROWN (1965)	Diacétylmonoxime 3 p. 100 dans éthanol 95° 0, 25 ml	Citrulline	Mélange PO ₄ H ₃ SO ₄ H ₂ (3/1) 2 ml		7, 25 ml	Bain-marie bouillant 15 minutes	Dosage de l'omithine carbamyltransférase et carbamylphosphate synthétase
BRUYET (1965)	Diacétylmonoxime 5 p. 100 dans acide acétique 5 p. 100 2 ml	Urée	AsO ₄ H ₃ 5 gp. 100 ds SO ₄ H ₂ 25 p. 100 4 ml		7 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes	
CERIOTTI et SPANDRIO (1965)	Diacétylmonoxime 0,5 p. 100 ds acide acétique 5 p. 100 1 ml	Urée	SO ₄ H ₂ 20 p. 100 8 ml	Phénazone 0, 2 p. 100 dans le réactif acide Fer 5 µg/ml	10 ml	Bain-marie bouillant 30 minutes	Coloration jaune citron
DAMM et KING (1965)		Méthode de Rosenthal					
FINGERHUT, FERZOLA, MARSH et MILLER (1965)	Diacétylmonoxime 0,085 p. 100	Urée	SO ₄ H ₂ 6 p. 100 PO ₄ H ₃ 1 p. 100	Thiosemicarbazide 0,018 p. 100 Cl ₂ Fe 0,010 p. 100 ds le réactif acide		Bain-marie 95°	Méthode pour appareil automatique
HARVEY et RICHARDS (1965)	Diacétylmonoxime 2 p. 100 dans acide acétique 2 p. 100 0, 5 ml	Urée	Mélange PO ₄ H ₃ -SO ₄ H ₂ -eau (75/25/70) 1 ml		5 ml	Bain-marie bouillant 30 minutes	
HAURY (1965)	Diacétylmonoxime 0, 6 g p. 100 0, 4 ml	Urée	PO ₄ H ₃ 50 p. 100 1 ml	Thiosemicarbazide 0,03 g p. 100 dans le réactif diacétylmonoxime	1, 45 ml	Bain-marie bouillant 20 minutes	
MAC LEAN et coll. (1965)		Méthode d'Archibald pour la citrulline (1944) et l'urée (1945) avec allongement du bain-marie à 15 minutes pour l'urée					
MARSH D.J. et coll. (1965)		Méthode de Beale et Croft (1961) adaptée en microméthode					
MARSH W.H., FINGERHUT et MILLER (1965)	Diacétylmonoxime 2,5 p. 100 (Mélanger 1 ml de diacétylmonoxime, 0,25 ml de thiosemicarbazide, 30 ml de mélange acide, 20 ml eau)	Urée	Mélange -SO ₄ H ₂ 8 ml -PO ₄ H ₃ 1 ml -FeCl ₃ 5 p. 100 1 ml -Eau distillée 100 ml	Thiosemicarbazide 0,25 p. 100 Fer dans réactif acide	3, 2 ml	Bain-marie bouillant 20 minutes	Méthode manuelle et pour appareil automatique
MOMOSE et coll. (1965)	Diacétylmonoxime 1 p. 100 dans acide acétique 5 p. 100 1 ml	Urée	PO ₄ H ₃ 60 p. 100 5 ml	Glucuronolactone 1 p. 100 dans réactif diacétylmonoxime	7 ml	Bain-marie bouillant 40 minutes	Coloration jaune (brun (λ=475m))
MORE et SAX (1965)	Diacétylmonoxime 0,3 p. 100 dans ClNa 15 p. 100	Urée	PO ₄ H ₃ 60 p. 100	Thiosemicarbazide 0,2 p. 100 ds le réactif diacétylmonoxime			Méthode pour appareil automatique

	Dicétone ou oxime utilisée	Composé étudié ou dosé	Milieu acide	Autres composés introduits dans la réaction	Volume total du mélange réactionnel	Temps de chauffage	Particularités
SIEST (1965)	Diacétylmonoxime M/10 ou (1 p. 100) 1 ml	Acide allantofurique (et urée)	AsO ₄ H ₃ 10 g dans 100 ml SO ₄ H ₂ 50 p. 100 2 ml		6 ml	Bain-marie bouillant 15 minutes	
SIEST G et SIEST D. (1965)	Diacétylmonoxime 1 g p. 100 0, 5 ml	Urée	Réactif phosphoré 2 ml		3 ml	Bain-marie bouillant 8 minutes	
WATTS et coll. (1965)		Méthode de Bronk et Fischer (1956)					
CERIOTTI et GAZZANIGA (1966)	Diacétylmonoxime 0,5 g p. 100 ds acide acétique 5 p. 100 0, 5 ml	Citrulline	SO ₄ H ₂ 40 p. 100 Fer 5 ug par ml 2 ml	Phénazone 4 g p. 1000 dans le réactif acide	5 ml	Bain-marie bouillant 30 minutes	Mesure de l'amplitude carbamyltransférase Ethyleneglycol 0,5 ml après le chauffage
COTTE (1966)		Méthode de MOMOSE et coll. (1965) adaptée en microméthode					
DUDEK (1966)	Diacétyl-dioxime 1,5 g p. 100 dans éthanol 1, 5 ml	Urée	SO ₄ H ₂ 0, 6 ml		12 ml environ	Bain-marie bouillant 50 minutes	
FINGERHUT et coll. (1966)	Diacétylmonoxime 0,08 g p. 100 avec CINA		PO ₄ H ₃ 300 ml FeCl ₃ 15 g Eau 150 ml	Thiosemicarbazide 0,13 g p. 100 ds le réactif diacétylmonoxime			Méthode automatique
HUNNINGHAKE et GRISOLIA (1966)	Diacétylmonoxime 3 p. 100 0, 5 ml	Urée-citrulline et dérivés carbamylés	SO ₄ H ₂ 0, 5 ml	Semidine 0,2 p. 100 0, 5 ml	3, 5 ml	Bain-marie à 90° 10 minutes	Solution de fer dans SO ₄ H ₂ ajouté après le chauffage 1 ml
JEROME (1966)	I II	Technique de ROSENTHAL					
	Diacétylmonoxime 0,75 g p. 100 ds acide acétique 5 p. 100 2 ml	Urée	SO ₄ H ₂ 500 ml PO ₄ H ₃ 500 ml Eau 500 ml Alun de fer 5 g 1 ml		4 ml	Bain-marie bouillant 10 minutes	

La lecture de ce tableau montre l'extrême diversité des techniques de dosage des substances carbamidées par les dicétones ou leurs oximes.

Schématiquement nous pouvons présenter un type de méthode sous la forme suivante :

Prise d'essai d'urée ou de dérivé carbamidé

Acide ou mélange d'acides

Solution de dicétone ou oxime

Développement de la réaction par chauffage,
Lecture photométrique.

Prenons maintenant un exemple précis : les techniques utilisant un réactif arsénico-sulfurique, milieu acide fréquemment utilisé.

En ce qui concerne le milieu acide, c'est KAWERAU (1946) qui propose pour la première fois un mélange $\text{As O}_4\text{H}_3 - \text{HCl}$. FRIEDMAN (1953) juge HCl trop volatil et le remplace par SO_4H_2 . ROSENTHAL (1955) au contraire ne tient pas compte de cet inconvénient, mais insiste sur la nécessité de définir avec précision l'acidité nécessaire à la réaction.

Ultérieurement la réaction est appliquée fréquemment, mais les concentrations d'acides sont variables (MARSH 1957, SKEGGS 1957, SARDOU 1958, ANDERSEN 1959, RICHTER et LAPOINTE 1959, BALDI 1960, FORSELL et PALVA 1960, FAUVERT et HARTMANN 1961, NOVAK 1961, GLASMACHER et PODZUS 1962, O'BRIEN et IBOTT 1962, MANOVA et coll. 1963, BRUYET 1965).

Nous notons que le réactif diacétylmonoxime est utilisé par KAWERAU en solution à 1 % en milieu acétique. Les quantités de réactifs varient d'une technique à l'autre. L'acide acétique est supprimé par FORSELL et PALVA.

Le développement de la coloration est obtenu par un chauffage à 100° . La durée de ce chauffage est variable : 20 minutes (KAWERAU) - 10 minutes (FRIEDMAN) - 5 minutes (SARDOU).

Enfin, une difficulté majeure réside dans la photosensibilité de la réaction colorée.

Ces quelques indications mettent en évidence des conditions très variables pour une même réaction. On conçoit que l'usage d'autres acides et d'adjuvants réactionnels ne fasse que multiplier les variations des modalités opératoires.

Nous avons essayé de tirer le meilleur parti des techniques qui avaient été proposées. Mais pour cela il fallait pouvoir les comparer. Devant la diversité

des conditions opératoires, nous avons dû commencer par définir un protocole expérimental, c'est-à-dire choisir l'acide et la dicétone, seuls réactifs indispensables au développement des réactions colorées des dérivés carbamidés.

Puis nous avons ajouté les composés susceptibles de modifier la réaction colorée (oxydants, réducteurs, métaux, solvants, etc ...).

En effet toute addition dans le milieu réactionnel ou toute modification des conditions opératoires peuvent influencer :

- . l'intensité des colorations
- . la cinétique de la réaction colorée
- . la stabilité des colorations

Ces trois caractères seront nos critères de comparaison.

Il est bien entendu difficile d'étudier toutes les combinaisons de réactifs : nous avons relevé l'introduction dans le mélange réactionnel de **soixante cinq composés différents**, en plus des dérivés carbamidés à étudier, et sans compter ceux utilisés pour l'application aux milieux biologiques. Nous ajouterons personnellement encore **plus de quarante autres composés**, (acides, dicétones ou oximes, anions, cations, solvants et intensifiants).

Enfin, le réactif dicétonique le plus fréquemment utilisé étant la diacétylmonoxime, c'est ce composé qui retiendra principalement notre intérêt. L'étude des réactions données par le diacétyle et la diacétylmonoxime, puis la phénylpropanedione et sa monoxime ne serviront que de point de comparaison.

D'autre part le principal composé carbamidé étant l'urée, notre étude expérimentale portera essentiellement sur les réactions colorées de l'urée.

ABREVIATIONS UTILISEES

CHD	Cyclohexanedione
D	Diacétyl
DD	Diacétyldioxime
DM	Diacétylmonoxime
Hx	Cycloheptanedionedioxime (Heptoxime)
Nx	Cyclohexanedionedioxime (Nioxime)
PPD	Phénylpropanedione
PPDD	Phénylpropanedionedioxime
PPDM	Phénylpropanedionemonoxime
ASS	Acide sulfosalicylique
PTS	Acide paratoluènesulfonique
RA	Réactif arsénicosulfurique
APA	Acide phénylanthranilique
DPS	Diphénylaminoparasulfonate de sodium
GLU	Glucuronolactone
PH	Phénylhydrazine (chlorhydrate)
TRY	Tryptophane
TSC	Thiosemicarbazide
BM	Bain-marie
BMB	Bain-marie bouillant
mn	minutes
nm	nanomètre (1 nm = 10 ⁹ Å)
VBC	Photomètre de Vernes Bricq et Constant

APPAREILLAGE ET TECHNIQUES

Les résultats expérimentaux présentés correspondent aux lectures effectuées avec les appareils suivants :

- . Spectrophotomètre Jean et Constant (Prolabo)
- . Spectrophotomètre Beckmann D.B.
- . Spectrophotomètre Safas
- . Spectrophotomètre Bonet et Maury
- . Photomètre de Vernes, Bricq et Constant

Sauf précisions complémentaires, les mélanges réactionnels ont un volume total de 6 ml et dès l'addition du dernier réactif qui a toujours été la dicétone, ils sont portés au bain-marie bouillant, à l'abri d'une forte luminosité. Le temps de chauffage écoulé, les tubes sont placés 10 minutes dans un bain d'eau froide à l'obscurité. Puis l'intensité des colorations est appréciée au photomètre.

Le diacétyl, la diacétylmonoxime et la diacétyldioxime donnent avec l'urée des colorations jaunes ayant un maximum d'absorption à 478 nm (graphique 1). Sauf indications contraires, les lectures ont donc été effectuées à 480 nm en cuve de 1 cm.

Les valeurs numériques présentées dans les tableaux correspondent aux densités optiques (DO) et dans les graphiques aux centièmes de densité optique.

CHAPITRE PREMIER

ETUDE DES ACIDES DANS LA REACTION UREE-DIACETYLMOXIME

Le tableau synoptique rassemble tous les acides ou mélanges acides qui ont été proposés. Nous y avons noté la concentration des acides, la quantité introduite et le volume total du mélange réactionnel. Il est donc possible de calculer les concentrations réelles des acides.

Le milieu chlorhydrique fut le premier qui ait été choisi par FEARON (1939) qui signalait cependant l'utilisation possible des acides sulfurique, phosphorique et trichloracétique. L'acide sulfurique est le plus utilisé. Sa concentration influence la stabilité des colorations (WHEATLEY 1948, VELAY 1957). L'acide phosphorique introduit seul dans le mélange réactionnel nécessite des temps de chauffage prolongés (HOLDEN 1959).

De nombreux auteurs ont proposé des mélanges d'acides, les plus fréquents étant $\text{SO}_4\text{H}_2 + \text{PO}_4\text{H}_3$ ou $\text{SO}_4\text{H}_2 + \text{AsO}_4\text{H}_3$ et plus rarement des mélanges contenant ClO_4H ou NO_3H .

L'acide trichloracétique ne fut proposé qu'une seule fois pour une appréciation semi-quantitative de l'urée (ABELIN 1940).

I - SENSIBILITE DE LA REACTION EN FONCTION DE L'ACIDE

Nous avons étudié la sensibilité de la réaction colorée urée-diacétylmonoxime en présence des acides préconisés dans les techniques déjà décrites et en présence d'autres acides que nous avons essayés parce qu'ils sont de manipulation plus aisée.

Nous avons utilisé des quantités d'urée variables ; le mode opératoire sera discuté ultérieurement. Dans ces conditions nous avons constaté que les acides se répartissent en trois groupes :

- Ceux qui permettent de déceler facilement $10 \mu\text{g}$ d'urée :

- . acides chlorhydrique
phosphorique
sulfurique
sulfosalicyclique
paratoluènesulfonique
trichloracétique

- Ceux qui ne donnent une coloration que pour des quantités d'urée de l'ordre de $50 \mu\text{g}$:

- . acides arsénique
citrique
formique

monochloracétique
perchlorique

- Ceux qui ne permettent pas d'obtenir la réaction colorée
 - . acides acétique
 - nitrique
 - borique
 - benzoïque
 - salicylique
 - acétylsalicylique

Influence de la qualité des acides sur la reproductibilité

L'intensité de la réaction colorée dépend, pour certains acides, de leur qualité (origine ou lot différents !).

- . PO_4H_3 - Les acides R-P ou Merck donnent des résultats identiques, mais des acides moins purs fournissent des colorations plus intenses (augmentation de l'ordre de 10 à 20 %).
- . SO_4H_2 - L'acide sulfurique est certainement l'acide donnant les résultats les moins reproductibles et l'origine de l'acide intervient de façon notable.

C'est ce que met en évidence le tableau ci-après.

Tableau 1 : Intensité des réactions colorées obtenues dans divers milieux sulfuriques

	Acide sulfurique (Union chimique belge)	Acide sulfurique (Prolabo)	Acide sulfurique (qualité R-P)	Acide sulfurique (Merck)
1er essai	0,74	0,73	0,52	0,75
	0,87	0,75	0,40	0,63
2ème essai	0,63	0,63	0,47	0,48
	0,63	0,46	0,48	0,51
3ème essai	0,54	0,39	0,45	0,40
	0,55	0,41	0,45	0,45

Les différences notées entre les acides ne semblent pas en relation avec la pureté. Précisons que ces résultats ont été obtenus après avoir strictement codifié le mode opératoire : à une prise d'essai de 30 μg d'urée, nous avons ajouté 1 ml de diacétylmonoxime M/10, 2 ml de SO_4H_2 à 50 % (v/v) et de l'eau distillée pour compléter à 6 ml. Le temps de chauffage était de 10 minutes exactement et les lectures étaient effectuées après 10 minutes de refroidissement dans un bain d'eau à 20° situé à l'obscurité.

- . ClO_4H - Les premiers essais effectués avec cet acide s'étaient montrés très satisfaisants. Nous avons obtenu une coloration intense avec 30 μg d'urée et la concentration la plus favorable en acide était introduite dans le milieu réactionnel par 1,25 à 1,75 ml de ClO_4H à 70 %.

Mais ce lot d'acide étant épuisé, jamais nous ne sommes arrivés à retrouver les résultats précédents même en utilisant plusieurs lots de ClO_4H d'origine différente ; les colorations étaient beaucoup moins intenses et la cinétique très différente du premier cas.

- . AsO_4H_3 - Nous n'avons pas eu de problème avec la qualité de cet acide, qualité mise en doute par IUCHI (1958) et GIRARD (1958).

Ces résultats nous ont fait abandonner l'acide perchlorique. Nous avons évité d'utiliser SO_4H_2 seul comme acide sauf pour des essais comparatifs et nous tenterons d'améliorer la reproductibilité des résultats en milieu sulfurique par l'addition d'autres composés. Quant à l'acide phosphorique nous utiliserons toujours des qualités "pour analyses".

II - INFLUENCE DE LA NATURE ET DE LA CONCENTRATION DES ACIDES

Etant données les inégales sensibilités que nous venons d'indiquer suivant les cas, nous avons développé la réaction soit sur 30, soit sur 150 μg d'urée ; nous avons utilisé la diacétylmonoxime en solution M/10 ou M/2.

- Solution d'urée M/1000 ou M/200 0, 5 ml
(soit 30 ou 150 μg)
- Diacétylmonoxime M/10 ou M/2 1 ml
- Acide volume variable
- Eau distillée q.s.p. 6 ml

Bain-marie bouillant 30 minutes
Refroidir 10 minutes. Lecture à 480 nm.

a) Intensité de la réaction

Dans le tableau 2 nous avons classé les acides dans l'ordre d'efficacité décroissante.

Tableau 2 : Quantité optima d'acide et intensité des colorations

	ml d'acide	μg d'urée	DM	D.O.
1) Acide sulfurique concentré	1	30	M/10	0,85
2) Acide chlorhydrique concentré	1, 5	30	M/10	0,65
3) Acide sulfosalicylique (ASS) solution à 50 % (p/v)	4	30	M/10	0,51
4) Acide phosphorique concentré solution à 85 % du commerce	2, 5	30	M/10	0,40
5) Acide paratoluènesulfonique (PTS) solution à 50 % (p/v)	2, 5	30	M/2	0,40
6) Acide trichloracétique solution à 100 % (p/v)	2	30	M/2	0,26
7) Acide arsénique solution à 40 % (p/v)	4, 5	150	M/2	0,33
8) Acide citrique solution à 60 % (p/v)	4, 5	150	M/2	0,30

Lorsque dans ce tableau, la quantité d'acide atteint 4, 5 ml, cela signifie qu'on utilise le plus grand volume de solution acide qu'on puisse introduire dans le volume total du mélange réactionnel, 6 ml ; autrement dit on n'a pas pu définir

un optimum de concentration (l'acide citrique à 60 % est en solution pratiquement saturée, et l'utilisation de solutions plus concentrées d'acide arsénique se heurte à une absorption propre de ces solutions).

Le graphique 2 présente pour ces acides les relations exactes entre leur concentration dans le milieu et l'intensité des colorations.

Pour faciliter la lecture et éviter des courbes trop enchevêtrées, les résultats présentés correspondent à des temps différents de chauffage ou des prises d'essai variables d'urée. Nous avons adopté cette présentation après avoir vérifié que les concentrations optima d'acide ainsi définies sont indépendantes de ces deux facteurs.

Ce graphique montre que la quantité d'acide nécessaire pour obtenir l'intensité maxima,

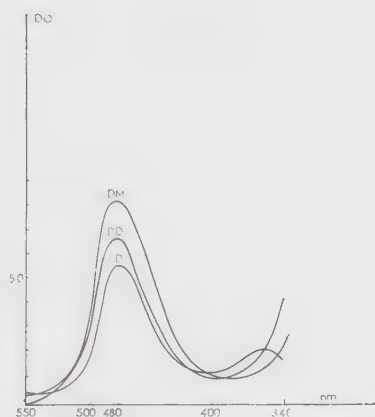
- est particulièrement critique pour HCl et SO_4H_2
- est moins limitée pour PO_4H_3 et surtout l'acide sulfosalicylique
- n'est pas très précise pour $\text{C Cl}_3\text{-COOH}$ et l'acide paratoluènesulfonique
- À partir d'une concentration suffisante les intensités obtenues varient peu
- n'existe pas pour AsO_4H_3 . L'intensité croît avec la quantité d'acide. Il en est de même pour l'acide citrique que nous n'avons pas représenté.

b) Cinétique de la réaction

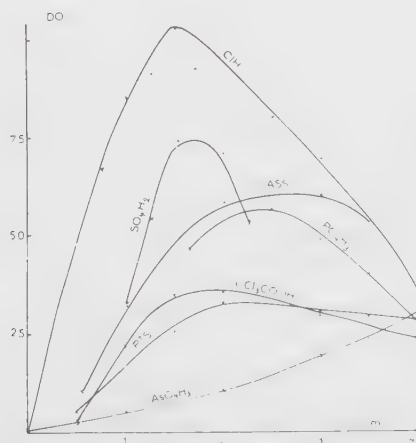
Le développement des réactions en fonction du temps de chauffage est représenté par les graphiques 3, 4, et 5. Les quantités d'acide utilisées sont celles trouvées les plus favorables, (tableau 2).

On peut grouper les acides en trois catégories :

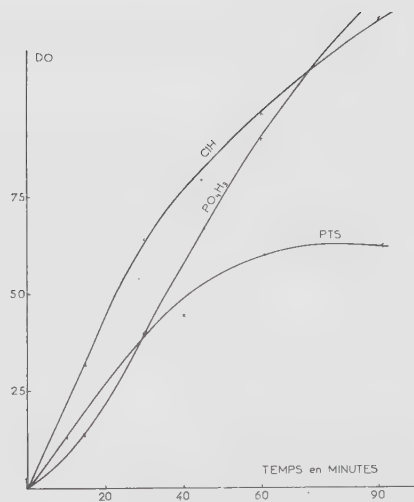
- a - Acides permettant d'atteindre une coloration entièrement développée par un chauffage de 30 minutes
 - . acide arsénique
- b - Acides capables de développer entièrement une coloration après un temps de chauffage de 60 à 90 minutes suivant les cas
 - . acide sulfosalicylique (60 minutes)
 - . acide trichloracétique (60 minutes)
 - . acide sulfurique (60 minutes)
 - . acide paratoluènesulfonique (90 minutes)
- c - Acides ne permettant jamais d'atteindre un développement complet des colorations en 90 minutes de chauffage
 - . acide phosphorique



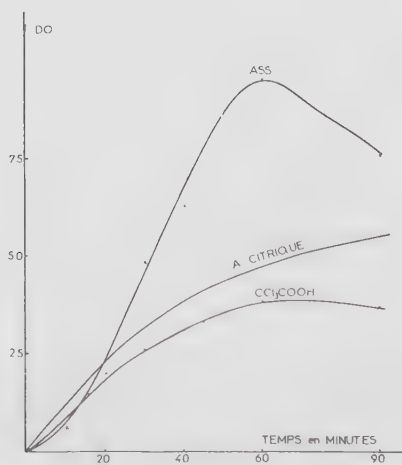
Graphique 1. Spectres d'absorption des réactions colorées de l'urée avec le diacétyle, la diacétylmonoxime et la diacétyldioxime



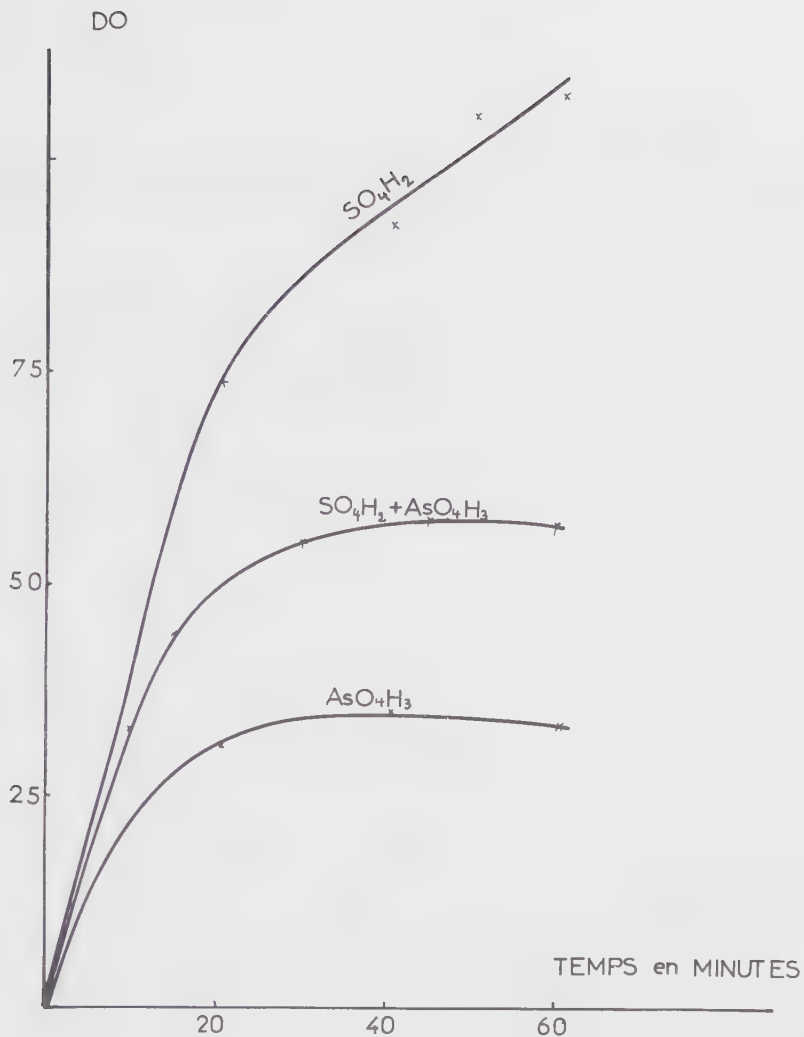
Graphique 2. Réaction urée-diacétylmonoxime.
Intensité en fonction de la concentration des acides



Graphique 3. Réaction urée-diacétylmonoxime.
Cinétique en milieu chlorhydrique, phosphorique et paratoluènesulfonique



Graphique 4. Réaction urée-diacétylmonoxime.
Cinétique en milieu sulfosalicylique, citrique et trichloracétique



Graphique 5. Réaction urée-diacétylmonoxime.
Cinétique en milieu sulfurique, arsénique et arsénicosulfurique.

- . acide citrique
- . acide chlorhydrique

Il est possible d'établir alors un nouveau classement des acides d'après l'intensité des colorations obtenues en se plaçant dans les conditions de chauffage les plus favorables.

Tableau 3 : Intensité des colorations à l'optimum de leur développement

	μg d'urée	Temps de BMB (en mn)	D.O.
1) Acide phosphorique	30	90	1,40
2) Acide chlorhydrique	30	90	1,20
3) Acide sulfurique	30	60	1,07
4) Acide sulfosalicylique	30	60	0,99
5) Acide paratoluènesulfonique	30	90	0,62
6) Acide trichloracétique	30	60	0,38
7) Acide citrique	150	90	0,54
8) Acide arsénique	150	30	0,36

c) Stabilité

Nous avons étudié en milieu sulfurique, phosphorique, trichloracétique, sulfosalicylique et arsénique, la stabilité des colorations à l'obscurité après leur développement et le refroidissement.

Nous avons constaté que les colorations sont stables au moins une heure à l'obscurité, puis s'affaiblissent ou s'intensifient suivant qu'elles ont été plus ou moins développées par le chauffage.

Nous avons montré par l'étude séparée de chaque acide que l'intensité des colorations est fonction de la nature et de la concentration de l'acide et du temps de chauffage. La cinétique de la réaction colorée varie également avec la nature des acides mais pas obligatoirement avec la concentration. Il faut remarquer la cinétique particulière avec AsO_4H_3 . La stabilité est fonction des deux paramètres précédents.

III - EFFETS DE L'EMPLOI SIMULTANE DE DEUX OU PLUSIEURS ACIDES

En introduisant plusieurs acides dans le même milieu nous avons essayé de remédier aux inconvénients de chaque acide pris isolément :

- acide sulfurique : résultats peu reproductibles
- acide phosphorique : cinétique lente
- acide arsénique : réaction colorée peu sensible

Nous poursuivons principalement deux buts :

- rendre plus rapide le développement de la réaction
- donner la préférence aux acides de manipulation facile

1) Le mélange acide phosphorique-acide sulfurique

A une quantité fixe de PO_4H_3 (2 ml) ont été ajoutées des quantités croissantes de SO_4H_2 à 50 %.

Le tableau 4 donne les résultats obtenus avec 30 μg d'urée et 1 ml de diacétylmonoxime M/10, dans un volume total de 6 ml.

Tableau 4 : Intensité de la réaction urée-diacétylmonoxime développée en milieu phosphorique. Effet de l'addition d'acide sulfurique à un milieu phosphorique.

SO_4H_2 50 % ml	0	0,5	1	1,5	2
BMB 15 mn	0,15	0,21	0,14	0,10	0,05
30 mn	0,40	0,48	0,35	0,25	0,14
60 mn	0,88	0,93	0,75	0,51	0,33

On constate une augmentation légère par une très faible quantité d'acide sulfurique. Mais, toute quantité supérieure a un effet inverse par excès d'acide. D'autres part la cinétique n'est pas améliorée.

2) Effets des additions d'acide sulfosalicylique ou paratoluènesulfonique aux autres milieux acides

Comme on pouvait s'y attendre, l'addition d'acide sulfosalicylique ou paratoluènesulfonique aux acides forts HCl , SO_4H_2 , PO_4H_3 et $\text{CCL}_3\text{-COOH}$ ne modifie pratiquement pas les réactions colorées, tandis qu'ils intensifient les colorations avec l'acide citrique, l'acide arsénique seuls. Les acides sulfosalicylique et paratoluènesulfonique permettent la formation d'une réaction colorée en milieu acétique.

3) Effet de l'addition d'acide nitrique à l'acide phosphorique

L'acide nitrique seul ne permet pas le développement d'une réaction colorée. Il est cependant utilisé en mélange avec d'autres acides (DREUX communication personnelle) même en méthode automatique, (WOOTON 1964).

A la concentration d'acide phosphorique trouvée la plus favorable (2,5 ml) nous avons ajouté des quantités croissantes d'acide nitrique : nous n'avons pas obtenu de coloration. Cet acide est en effet très rapidement inhibiteur. Le tableau 5 présente les résultats obtenus avec une solution diluée d'acide nitrique.

Tableau 5 : Intensités de la réaction urée-diacétylmonoxime en milieu phosphorique après addition d'acide nitrique

NO_3H 5 % (v/v) ml	0	0,1	0,2	0,5	1	2
BMB 30 mn	0,36	0,44	0,45	0,53	0,02	0,01
60 mn	0,67	0,75	0,79	0,92	0	0

L'acide nitrique en solution très diluée intensifie les réactions colorées développées en milieu phosphorique sans modifier la cinétique. Mais sa concentration est critique. L'intérêt de ce mélange est donc limité et la manipulation de cet acide étant de plus désagréable, nous n'utiliserons plus un tel réactif.

4) Effets de l'addition d'acide arsénique à d'autres acides

L'acide arsénique qui est considéré comme un oxydant a été souvent utilisé en mélange avec SO_4H_2 ou avec HCl . Nous avons mis en évidence que cet acide donne une réaction colorée de développement rapide et nous avons tenté d'améliorer par AsO_4H_3 la cinétique des réactions colorées obtenues dans divers milieux acides.

a) Acide arsénique et acide citrique

Cette association avait pour but d'activer le développement de la coloration par l'acide citrique qui est lent, et éventuellement de la rendre plus intense.

La réaction a été faite sur 150 μg d'urée en présence de 1 ml de diacétylmonoxime M/2.

Tableau 6 : Intensité de coloration en présence d'acide arsénique et d'acide citrique

Acide citrique 60 % (p/v) ml	3	3	3	0	0,5	1,5
Acide arsénique 40 % (p/v) ml	0	0,5	1,5	3	3	3
BMB 15 mn	0,08	0,16	0,38	0,37	0,45	0,60
30 mn	0,22	0,30	0,60	0,58	0,66	0,85

On constate effectivement une accélération de la cinétique et une élévation de l'intensité.

b) Acide arsénique et acide sulfosalicylique

La réaction est faite sur 30 μg d'urée en présence d'1 ml de diacétylmonoxime M/10.

Tableau 7 : Intensité de coloration en présence d'acide arsénique et d'acide sulfosalicylique

	Acide sulfosalicylique 60 %						
	1,5 ml				3 ml		
Acide arsénique ml 40 %	0	1	2	3	0	1	1,5
BMB 15 mn	0,08	0,03	0,10	0,14	0,23	0,23	0,23
30 mn	0,15	0,26	0,27	0,30	0,43	0,49	0,50

Comme le montre ce tableau, lorsque l'acide sulfosalicylique ne donne qu'une faible coloration (1,5 ml) l'acide arsénique augmente celle-ci ; mais il est inefficace quand on utilise une quantité d'acide sulfosalicylique qui, sans atteindre la quantité optimum (4 ml), développe par elle-même une coloration très nette. De plus l'acide arsénique ne modifie pas la cinétique.

c) Acide arsénique et acide sulfurique, phosphorique, chlorhydrique

Tableau 8 : Intensités des réactions colorées après addition d'acide arsénique aux milieux sulfurique et phosphorique

	Acide sulfurique (2 ml à 50 % v/v)					Acide phosphorique (2 ml)				
	0	0,5	1	1,5	2	0	0,5	1	1,5	2
AsO ₄ H ₃ à 40 % ml										
BMB 15 mn	0,44	0,45	0,42	0,41	0,42	0,13	0,25	0,33	0,37	0,45
30 mn	0,76	0,53	0,48	0,45	0,44	0,45	0,63	0,69	0,75	0,80
60 mn	1	0,55	0,48	0,43	0,42	0,75	0,95	0,97	1	1

Dans cet essai pratiqué sur 30 µg d'urée avec 1 ml de diacétylmonoxime M/10, SO₄H₂ et PO₄H₃ sont utilisés à la dose trouvée optimum. Dans ces conditions, AsO₄H₃ bloque la réaction obtenue en présence de SO₄H₂ au stade de développement atteint en 15 minutes de bain-marie bouillant, dès qu'on l'utilise à la dose de 1 ml.

Au contraire, en présence de PO₄H₃ la réaction est intensifiée à tous ses stades de développement et quelle que soit la quantité d'AsO₄H₃. Cette intensification croît avec la quantité d'AsO₄H₃.

Ajouté à HCl, AsO₄H₃ n'intervient qu'à une dose élevée (3,5 ml et se montre alors inhibiteur.

L'intensification de coloration obtenue par AsO₄H₃ + PO₄H₃ étant intéressante, nous nous sommes demandé si une plus grande quantité d'AsO₄H₃ associée à une faible dose de PO₄H₃ manifesterait en outre un effet stabilisateur analogue à celui qu'on observe avec SO₄H₂.

D'où l'expérience suivante :

Tableau 9 : Intensités des colorations après addition d'acide arsénique à des milieux contenant une faible proportion d'acide phosphorique ou chlorhydrique

Acide arsénique à 40 % ml	Acide phosphorique 1 ml				Acide chlorhydrique 0,5 ml			
	2	2,5	3	3,5	2	2,5	3	3,5
BMB 15 mn	0,31	0,37	0,41	0,45	0,28	0,28	0,27	0,26
30 mn	0,41	0,41	0,46	0,54	0,47	0,46	0,45	0,38

Ces résultats montrent que AsO_4H_3 ne stabilise pas la coloration au stade atteint à 15 minutes de chauffage.

Il résulte de ces essais que AsO_4H_3 intensifie les réactions obtenues en présence d'acide citrique et de PO_4H_3 si bien que le développement de la coloration à 15 minutes est égal (cas de PO_4H_3) ou même supérieur (cas de l'acide citrique) à celui qui est atteint en 30 minutes.

Cette accélération de la cinétique permettrait donc par association $\text{AsO}_4\text{H}_3 + \text{PO}_4\text{H}_3$ ou $\text{AsO}_4\text{H}_3 + \text{acide citrique}$, d'obtenir une coloration très mesurable dès 15 minutes.

Cependant, la réaction continuant à se développer à mesure que le chauffage est poursuivi, on est exposé à des erreurs dues à la stricte observance nécessaire de ce temps de chauffage, et à une évolution après chauffage.

AsO_4H_3 stoppe la réaction obtenue en présence de SO_4H_2 . On obtient donc une réaction entièrement développée après un temps de chauffage court.

C'est ce que montre bien le graphique 5, correspondant aux conditions trouvées les plus favorables précédemment pour SO_4H_2 et AsO_4H_3 (voir tableau 2). La troisième courbe de cinétique a été obtenue avec le mélange SO_4H_2 50 % 2 ml - AsO_4H_3 40 % 0,5 ml.

On perd en sensibilité de lecture, mais on gagne en stabilité. On comprend donc que le mélange $\text{AsO}_4\text{H}_3 + \text{SO}_4\text{H}_2$ ait été utilisé par de nombreux auteurs (tableau synoptique).

Nous avons donc examiné, dans nos conditions opératoires, les meilleures proportions à adopter.

IV - ETUDE DU REACTIF ARSENICOSULFURIQUE

Nous utiliserons désormais sous le nom de réactif arsénicosulfurique le

mélange : AsO_4H_3 10 g
 SO_4H_2 50 % 100 ml

Nous avons défini la concentration de réactif convenant le mieux au point de vue intensité de coloration, développement et stabilité par les expériences suivantes :

a) Intensité de coloration en fonction de la quantité de réactif

Les résultats obtenus pour 30 μg d'urée et 1 ml de diacétylmonoxime M/10, dans un volume total de 6 ml figurent sur le graphique 6.

Pour les deux temps de bain-marie (15 et 30 minutes), la concentration optima en réactif arsénicosulfurique est de 1,5 ml.

b) Cinétique de la réaction

Le graphique précédent permettait déjà d'entrevoir que la concentration du milieu en réactif intervenait sur l'évolution des colorations en fonction du temps de chauffage.

Sur le graphique 7 figurent les intensités de coloration obtenues en fonction du temps de chauffage en présence de trois quantités de réactif (1,5 - 2 - 2,5 ml).

On constate que la cinétique de la réaction dépend de la concentration en réactif arsénicosulfurique.

La coloration a atteint une intensité maxima en :

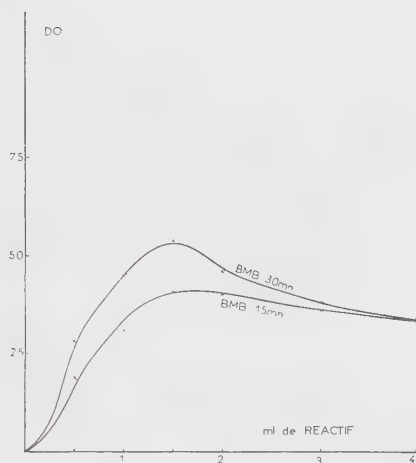
- 45 minutes avec 1,5 ml de réactif
- 30 minutes avec 2 ml de réactif
- 20 minutes avec 2,5 ml de réactif.

Plus la réaction s'est développée lentement, plus la coloration est intense.

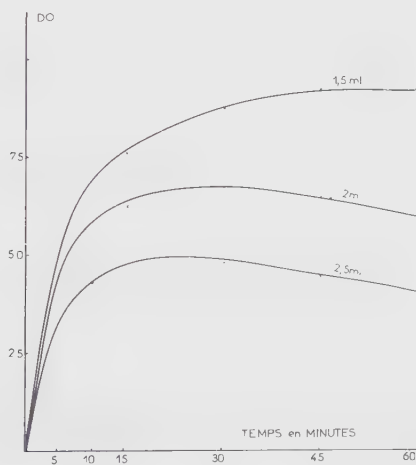
L'augmentation simultanée de l'acide sulfurique et de l'acide arsénique permet donc de réduire le temps de chauffage, mais au détriment de l'intensité des colorations.

c) Stabilité des colorations

Le tableau 10 présente l'évolution des colorations laissées à l'abri de la lumière après développement au bain-marie bouillant.



Graphique 6. Réaction urée-diacétylmonoxime.
Intensité en fonction de la quantité de réactif arsénicosulfurique.



Graphique 7. Réaction urée diacétylmonoxime.
Cinétique en fonction de la quantité de réactif arsénicosulfurique.

Tableau 10 : Stabilité des colorations en fonction de la concentration en réactif arsénicosulfurique

R.A. ml	BMB 15 mn						BMB 30 mn					
	0,5	1	1,5	2	3	4	0,5	1	1,5	2	3	4
1ère lecture (après refroidissement)	0,19	0,31	0,41	0,40	0,36	0,24	0,28	0,45	0,54	0,46	0,38	0,24
2ème lecture (après 90 mn)	0,21	0,32	0,42	0,41	0,37	0,26	0,29	0,45	0,54	0,47	0,38	0,25
3ème lecture (après 24 h)	0,30	0,44	0,53	0,48	0,40	0,27	0,32	0,49	0,56	0,47	0,37	0,24

Pour les deux temps de bain-marie bouillant, nous pouvons remarquer l'excellente stabilité des colorations pendant 90 minutes, temps largement suffisant pour les lectures en pratique courante.

Par contre, les lectures après 24 heures montrent que les colorations chauffées seulement pendant 15 minutes, continuent à se développer d'autant plus que la concentration du réactif arsénicosulfurique est plus faible ; elles se rapprochent alors pratiquement de celles qui ont été obtenues par chauffage pendant 30 minutes.

Le temps de chauffage de 30 minutes donne des colorations plus stables.

Les trois critères habituels retenus pour définir le réactif arsénicosulfurique permettent de faire un choix pour la quantité de réactif à introduire dans 6 ml de volume réactionnel final :

- du point de vue intensité, nous avons vu que les variations étaient limitées entre 1 et 3 ml de réactif arsénicosulfurique, la quantité optima étant 1,5 ml
- du point de vue cinétique, on atteint plus vite une coloration entièrement développée lorsque la concentration en acide est plus forte
- du point de vue stabilité aussi, une forte concentration en acide est souhaitable.

Pour concilier ces trois facteurs, nous utiliserons donc généralement avec la diacétylmonoxime, 2 ml de réactif arsénicosulfurique pour 6 ml de volume final mais la quantité de réactif acide à introduire dans le milieu réactionnel pourra varier en fonction du but poursuivi :

- coloration intense et sensible (1,5 ml optima)
- coloration rapidement développée (3 ml optima)

De même le temps de chauffage retenu sera de 20 minutes avec 2 ml de réactif arsénicosulfurique. Mais un temps supérieur devra être utilisé si l'on désire une coloration plus stable.

CONCLUSION

Nous avons montré que les acides avaient une grande importance sur la formation des complexes colorés entre diacétylmonoxime et urée. Recherchant des acides de manipulation plus aisée que ceux habituellement préconisés : SO_4H_2 - PO_4H_3 - HCl , nous avons montré qu'on pouvait éventuellement utiliser l'acide citrique, l'acide arsénique (seul), l'acide paratoluènesulfonique, l'acide sulfosalicylique et l'acide perchlorique. Les acides oxydants ne sont pas nécessaires, la réaction pouvant même se développer avec l'acide formique réducteur.

Mais l'acide perchlorique ne donne aucune garantie de fidélité, ressemblant sur ce point à SO_4H_2 .

Cependant, à titre de comparaison, nous présenterons dans ce travail, des résultats obtenus avec SO_4H_2 , lorsque nous avons tenté d'améliorer la reproductibilité.

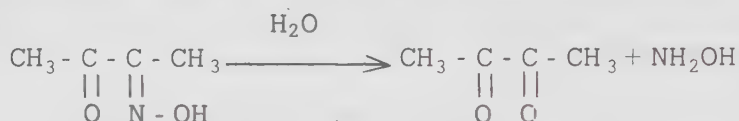
Les acides sulfosalicylique et paratoluènesulfonique donnent des colorations intenses, voisines de celles obtenues avec les acides forts. Parmi ces derniers, l'acide phosphorique qui est de manipulation plus aisée que l'acide chlorhydrique et qui donne des résultats plus reproductibles que SO_4H_2 aura souvent notre préférence. L'inconvénient majeur avec PO_4H_3 étant la cinétique lente des réactions, nous tenterons d'améliorer ce phénomène par la suite.

De l'étude de mélanges d'acides on peut retenir essentiellement l'avantage de l'addition d'acide arsénique à l'acide sulfurique qui permet d'améliorer la reproductibilité des colorations développées en milieu sulfurique et de les stabiliser. On perd en sensibilité mais on gagne en fidélité : 0,5 ml d' AsO_4H_3 à 40 % et 1 ml de SO_4H_2 concentré sont les quantités les plus favorables d'acides à introduire dans 6 ml de volume total. Ces proportions correspondent à 2 ml de réactif arsénicosulfurique, réactif proposé par de nombreux auteurs et que nous utiliserons donc également.

CHAPITRE DEUXIEME

ETUDE DE LA DIACETYLMOXIME, REACTIF DE L'UREE

La diacétylmonoxime avait été préconisée en remplacement du diacétyl parce que plus stable, (FEARON 1939). C'est un produit cristallisé, de bonne conservation et soluble dans l'eau. La diacétylmonoxime libère du diacétyl par hydrolyse en milieu acide avec formation simultanée d'hydroxylamine.



Elle présente un spectre d'absorption caractéristique dans l'ultra-violet avec un maximum à 225 nm.

La quantité de diacétylmonoxime à introduire dans le mélange réactionnel semble ne pas avoir beaucoup retenu l'attention. Comme le montre le tableau synoptique, les quantités utilisées sont variables.

Les premiers auteurs préparaient une solution aqueuse de monoxime et ce n'est que plus tard que l'on a proposé une solution acétique (KAWERAU 1946), modification reprise ensuite par de nombreux auteurs à l'exception de FORSELL et PALVA (1961).

Nous avons travaillé au départ avec une telle solution. Mais, la présence de cet acide s'étant montrée gênante pour certains essais, nous avons été amené à vérifier son rôle exact. CH_3COOH ajouté à la concentration de 5 % dans le réactif diacétylmonoxime est sans action sur l'intensité et sur la cinétique de la réaction. Il ne modifie pas non plus la conservation du réactif (la vérification, par examen du spectre ultra-violet de la diacétylmonoxime, a montré en particulier que la diacétylmonoxime ne s'hydrolysait pas dans ce milieu).

Cet acide étant inutile et provoquant même une cristallisation des solutions concentrées de diacétylmonoxime, nous avons décidé de n'utiliser la monoxime qu'en solution aqueuse.

I - DEFINITION DU REACTIF A LA DIACETYLMOXIME

Nous avons déterminé dans le chapitre précédent les quantités optima d'acides à utiliser dans des conditions que nous nous étions fixées.

Il restait à préciser si la concentration adoptée en diacétylmonoxime était effectivement la meilleure. Ce qui nous amenait à examiner l'influence de quantités variables de réactif sur l'intensité, la cinétique et la stabilité des colorations.

a) Intensité de coloration en fonction de la quantité de diacétylmonoxime

La réaction est faite sur 30 μg d'urée. Nous avons utilisé des quantités croissantes de diacétylmonoxime en solution M/2 (5,05 %) ou M/10 (1,01 %) (bain-marie bouillant 30 minutes).

Le tableau 11 donne les résultats obtenus en présence des quantités optima précédemment définies de HCl , SO_4H_2 , PO_4H_3 , réactif arsénicosulfurique.

Tableau 11 : Intensité des colorations obtenues en présence de divers acides et de quantités variables de diacétylmonoxime

Diacétylmonoxime M 2 ml	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1
Acide chlorhydrique 1,5 ml	0,26	0,45	0,60	0,68	0,60	0,58	0,36
Acide sulfurique à 50 % (v/v) 1,5 ml	0,24	0,45	0,57	0,55	0,54	0,35	0,23
Acide phosphorique 2,5 ml	0,17	0,41	0,46	0,50	0,48	0,43	0,29
Réactif arsénicosul- furique 2 ml	0,12	0,36	0,52	0,60	0,60	0,60	0,54

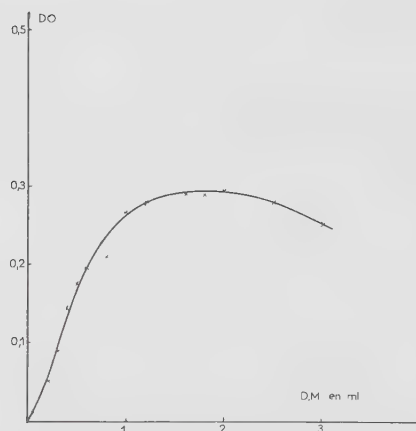
Il apparaît que 0,05 ml de diacétylmonoxime M/2 est nettement insuffisant ; avec 0,2, 0,3 et 0,4 ml nous avons des colorations les plus intenses. Un grand excès de diacétylmonoxime est inhibiteur.

Avec la concentration M/10 de diacétylmonoxime nous avons exploré plus finement les intervalles optima définis précédemment : on atteint pratiquement une intensité maxima dès 0,7 à 0,8 ml de diacétylmonoxime M/10 avec les quatre acides et les colorations ne varient pas jusqu'à 1,6 à 2,5 ml, la concentration optima exacte correspondant à 1,5 ml.

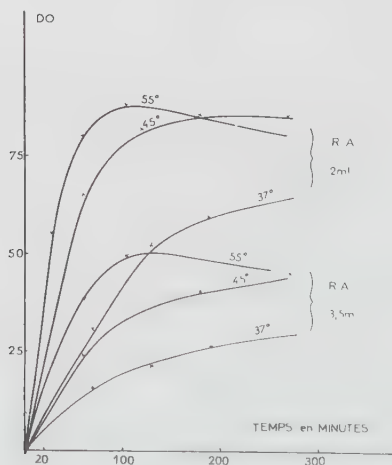
C'est ce que met encore plus particulièrement en évidence le graphique 8 qui représente les colorations obtenues par 30 μg d'urée dans un milieu contenant 2 ml de réactif arsénicosulfurique. La quantité minima de diacétylmonoxime faisant apparaître une coloration est 500 μg (0,05 ml de diacétylmonoxime M/10). Pour développer une coloration d'intensité maxima, il faut introduire 1 à 3 ml de diacétylmonoxime M/10 dans 6 ml de milieu.

C'est d'ailleurs ce qui ressort du tableau synoptique : les quantités de diacétylmonoxime utilisées par les différents auteurs correspondraient dans nos conditions opératoires, à des concentrations qui s'échelonnaient à peu près entre 0,5 et 3 ml de diacétylmonoxime M/10.

Une forte concentration en diacétylmonoxime est donc nécessaire pour doser une faible quantité d'urée.



Graphique 8. Réaction urée-diacétylmonoxime
Intensité en fonction de la concentration en diacétylmonoxime



Graphique 9. Réaction urée-diacétylmonoxime
Intensité et cinétique à 37°, 45° et 55°

Nous avons vérifié qu'inversement une forte concentration d'urée permet de déceler de faibles quantités de diacétylmonoxime : 6 mg d'urée donnent encore une coloration avec 10 μ g de diacétylmonoxime. Par commodité nous utiliserons habituellement avec ces quatre milieux acides, 1 ml de diacétylmonoxime M/10, quantité suffisante.

En présence d'acides faibles, la quantité de réactif diacétylmonoxime doit être plus élevée pour obtenir une intensité maxima.

C'est ainsi que la densité optique des colorations développées par 1 ml de diacétylmonoxime M/10 et 1 ml de diacétylmonoxime M/2 est respectivement de :

- 0,08 et 0,26 avec l'acide trichloracétique
- 0,12 et 0,52 avec l'acide citrique
- 0,30 et 0,60 avec l'acide arsénique
- 0,15 et 0,37 avec l'acide paratoluènesulfonique

Pour ces milieux acides la quantité de 1 ml de diacétylmonoxime M/10 est donc insuffisante. D'ailleurs dans le premier chapitre, nous avons (sans l'expliquer) utilisé deux sortes de solution de diacétylmonoxime : M/10 et M/2.

L'étude des concentrations optima de diacétylmonoxime avec différents acides a confirmé ce résultat. Les quantités de diacétylmonoxime M/2 donnant les colorations les plus intenses sont :

- 1,5 ml pour l'acide trichloracétique
- 3 ml pour l'acide citrique
- 1,2 ml pour l'acide paratoluènesulfonique
- 4 ml pour l'acide arsénique

Seul l'acide sulfosalicylique ne nécessite pas une quantité de diacétylmonoxime supérieure à celle trouvée avec les quatre acides forts précédents.

C'est avec les acides les moins favorables au développement d'une réaction colorée intense qu'il faut la plus grande quantité de diacétylmonoxime.

b) Cinétique et stabilité des réactions colorées en fonction de la quantité de diacétylmonoxime

Les avantages présentés par le réactif arsénicosulfurique nous ont fait choisir ce milieu acide pour cette étude.

Pour avoir des variations plus nettes nous avons utilisé de faibles concentrations de diacétylmonoxime.

Tableau 12 : Cinétique et stabilité en fonction de la concentration en diacétylmonoxime

Temps de chauffage	DM 1 ml de solution	1ère lecture	2ème lecture (après 24 h)	Pourcentage d'augmentation
5 mn	M/ 10	0,85	0,90	6 %
	M/ 50	0,45	0,72	60 %
	M/ 200	0,13	0,40	207 %
10 mn	M/ 50	0,62	0,87	39 %
	M/ 200	0,16	0,36	124 %
30 mn	M/ 50	1,04	1,17	12 %
	M/ 200	0,19	0,32	68 %
60 mn	M/ 50	0,95	0,95	0 %
	M/ 200	0,15	0,20	33 %

L'examen de ce tableau montre que la concentration en diacétylmonoxime n'intervient pas sur la cinétique puisque l'on trouve une coloration maxima à 30 minutes de bain-marie bouillant. Seule l'intensité de la coloration augmente avec la concentration en diacétylmonoxime.

Une seconde lecture photométrique 24 heures après l'obtention des colorations (placées à l'abri de la lumière), met en évidence des stabilités variables : on constate que les colorations continuent à se développer après le chauffage. Une concentration élevée de diacétylmonoxime est un facteur de stabilité puisque les colorations évoluent d'autant moins qu'elles sont plus développées.

Nous avons constaté qu'en présence d' AsO_4H_3 seul ou d'acide sulfosalicylique, la concentration en diacétylmonoxime n'avait également pas d'influence sur le développement de la coloration en fonction du temps de chauffage.

II - REACTIONS COLOREES DEVELOPPEES A TEMPERATURE INFERIEURE A 100°

Il avait été signalé que les réactions colorées se formaient lentement à température ordinaire (ORMSBY 1942, ARCHIBALD 1944, LECLERC et SCHWARTZ 1957). Mais une seule technique utilisant une température de 60° a été proposée (GERHARDT et PARDEE 1962), technique complexe introduisant un composé intensifiant et du persulfate.

Nous nous sommes demandé si la diacétylmonoxime pouvait développer des colorations valables avec l'urée en milieu acide à des températures plus faibles que celles du bain-marie bouillant ou du bain d'éthylèneglycol (réglé à

95°) utilisé dans les appareils automatiques d'analyses.

Ici aussi nous avons choisi comme acide le réactif arsénicosulfurique.

Nous avons utilisé des températures bien définies : 37° - 45° - 55°.

Le graphique 9 représente l'évolution des colorations en fonction du temps de développement et de la quantité de réactif arsénicosulfurique (RA).

On constate :

1 - qu'à basses températures comme à 100°, la quantité de réactif convenant le mieux est 2 ml, alors qu'on aurait pu penser qu'un développement de coloration à températures relativement basses serait amélioré par une augmentation de réactif acide.

2 - la cinétique s'accélère quand la température s'élève ; c'est seulement à 55° qu'on peut obtenir - dans les limites de l'observation - un maximum d'intensité nettement défini. Il est atteint vers 100 minutes, ensuite la coloration diminue.

Le tableau 13 présente les résultats obtenus en présence de quantités variables de diacétylmonoxime, à une température de 37° (urée = 60 µg).

Tableau 13 : Intensités des réactions colorées développées à 37° en fonction de la concentration en diacétylmonoxime.

DM M/10 ml	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
1ère lecture après 60 mn	0,18	0,26	0,36	0,41	0,46	0,51	0,52	0,54	0,55	0,57
2ème lecture après 4 h	0,33	0,44	0,51	0,50	0,50	0,49	0,44	0,39	0,35	0,35
3ème lecture après 24 h	0,47	0,50	0,49	0,44	0,39	0,35	0,29	0,25	0,24	0,24

Les colorations se développent d'autant plus rapidement que les quantités de diacétylmonoxime sont plus élevées. A partir d'une certaine valeur (0,5ml) la prolongation du séjour à 37° provoque un affaiblissement, ce qui est nettement différent des résultats obtenus au bain-marie bouillant. Les faibles concentrations en diacétylmonoxime donnent des colorations aussi intenses qu'en présence de plus fortes concentrations.

Après refroidissement, les colorations restent stables 30 minutes puis elles deviennent plus intenses et cela d'autant plus qu'elles ont moins longtemps été maintenues à 37°.

Une étude similaire a été effectuée en milieu phosphorique. Les colorations s'y développent plus lentement mais sont plus intenses.

Ces quelques essais mettent en évidence l'utilisation possible d'une température inférieure à 100° , pour développer cette réaction colorée. Mais la durée du chauffage et la reproductibilité plus difficile des résultats due au développement continu de la réaction, sont des inconvénients. Nous avons tenté de les améliorer.

CONCLUSION

Après avoir fait remarquer l'inutilité de l'acide acétique dans le réactif à la diacétylmonoxime, nous avons cherché à définir les concentrations les meilleures de monoxime en présence de divers acides.

Nous avons montré d'abord que l'intensité des colorations est fonction de cette concentration. Un grand excès de diacétylmonoxime est nécessaire pour obtenir une coloration intense avec l'urée. C'est ainsi qu'il faut pour 30 à 150 μ g d'urée, 10 à 100 mg de diacétylmonoxime, c'est-à-dire des quantités au moins cent fois plus élevées.

La concentration optima en diacétylmonoxime étant variable suivant la nature de l'acide, nous avons montré qu'il faut utiliser 1 ml de diacétylmonoxime M/10 en milieu sulfurique, phosphorique, chlorhydrique, arsénico-sulfurique et sulfosalicylique et des quantités de l'ordre de 1 ml de diacétylmonoxime M/2, soit cinq fois plus en milieu citrique, arsénique, paratoluènesulfonique et trichloracétique. Par contre les concentrations optima en diacétylmonoxime définies sont indépendantes de la concentration de ces mêmes acides.

Nous avons également mis en évidence que la concentration en diacétylmonoxime influençait très nettement la stabilité des colorations, stabilité d'autant meilleure que la concentration est plus élevée. Mais le développement des réactions colorées par le chauffage est indépendant de la quantité de diacétylmonoxime introduite dans le milieu réactionnel.

Enfin la diacétylmonoxime est capable de développer des colorations avec l'urée à température inférieure à 100°.

CHAPITRE TROISIEME

ETUDE DES COMPOSES INTERFERANT DANS LA REACTION UREE-DIACETYLMONOXIME

Nous avons rassemblé en quatre groupes, les composés ajoutés dans le milieu réactionnel, en plus des acides, des dicétones et des dérivés carbamidés à doser :

- les oxydants et les réducteurs
- les sels métalliques
- certains solvants alcooliques et cétoniques
- enfin les substances diverses dont la propriété essentielle est de rendre les colorations plus intenses

A - LES SUBSTANCES OXYDANTES ET REDUCTRICES

L'examen du tableau synoptique nous montre que dans de nombreuses techniques sont introduites des oxydants. Dès la mise au point de la réaction colorée, les oxydants furent préconisés pour intensifier la réaction diacétylmonoxime-dérivé carbamidé (FEARON 1939) et longtemps utilisés comme tels (GORNALL 1941, ORMSBY 1942, BARKER 1944, etc ...).

NATELSON, SCOTT et BEFFA (1951) effectuant un essai avec le diacétyle n'obtenaient pas d'intensification après addition de persulfate. Comme le diacétyle, contrairement à la diacétylmonoxime, ne libère pas d'hydroxylamine par hydrolyse, ces auteurs en conclurent que ce dernier composé était responsable de la différence de réactivité observée entre le diacétyle et la diacétylmonoxime. Cette hypothèse a été reprise par de nombreux auteurs, et à partir de cette publication, les oxydants ont été préconisés pour compenser les propriétés réductrices de l'hydroxylamine. Certains auteurs ont même proposé des méthodes spécifiques pour éliminer l'hydroxylamine (CERIOTTI et SPANDRIO 1963, KULHANEK et coll. 1963).

Suivant les techniques, l'introduction d'oxydants se fait :

- soit après le chauffage
 - . persulfate (FEARON 1939, GORNALL 1941, ORMSBY 1942, BARKER 1944, WHEATLEY 1948, JANCIC 1952, KORITZ et COHEN 1954, PERROT 1955, VELAY 1957, CROKAERT et SCHRAM 1958, etc ...)
 - . chloramine T (GIRARD et DREUX 1958, FAUVERT et HARTMANN 1960)

- soit avant le chauffage
 - . acide arsénique (KAWERAU 1946)
 - . acide perchlorique (IUCHI 1958)
 - . persulfate, nitrate, sel de cerium (MARSH et coll. 1957)
 - . nitrate (BEALE et CROFT 1961)
 - . sel de fer (RICHTER et LAPOINTE 1962)

Cependant tous les auteurs ne préconisent pas l'utilisation d'oxydants, le mélange PO_4H_3 - SO_4H_2 a même été étudié pour les éviter (ARCHIBALD 1944).

L'addition d'oxydants, en particulier après le chauffage rend la reproductibilité des colorations plus difficile : elles deviennent "capricieuses" (HENRY 1964) : elles s'intensifient plus ou moins rapidement suivant la concentration en urée (ORMSBY 1942). C'est pourquoi une codification soigneuse de la technique est nécessaire (CROKAERT et SCHRAM 1958) et la concentration de l'oxydant est à bien préciser.

L'hypothèse suivant laquelle l'oxydant neutraliserait les propriétés réductrices de l'hydroxylamine n'est nullement une certitude.

En effet en développant en présence d'acide arsénique ou de persulfate une réaction colorée avec du diacétyle, nous avons obtenu des colorations plus intenses. Or il n'y avait pas dans ce cas d'hydroxylamine à détruire.

En ajoutant de l'hydroxylamine dans des milieux réactionnels avec le diacétyle et la diacétylmonoxime, en présence et en absence d'acide arsénique ou de persulfate, nous avons obtenu des colorations moins intenses aussi bien avec le diacétyle qu'avec la diacétylmonoxime et, surtout, même en présence des deux composés oxydants.

I - EFFETS DES OXYDANTS AJOUTES AVANT LE CHAUFFAGE

Nous avons étudié l'activité des composés suivants :

- nitrate de sodium R-P
- arséniate de sodium R-P
- persulfate de sodium R-P
- acide arsénique
- chlorate de potassium R-P
- chloramine T

Dans une première série d'essais nous avons testé l'influence des oxydants ajoutés avant le chauffage en introduisant 0,5 ml de solutions M/10, M/100 et M/1000 dans des mélanges réactionnels contenant 30 μg d'urée.

Puis avec les composés qui se sont révélés actifs, nous avons poursuivi les essais avec des solutions de molarité supérieure ou inférieure.

Nous avons étudié comparativement la réactivité de ces composés en milieu sulfurique et phosphorique puis en milieu chlorhydrique.

Voici dans le tableau 14 les résultats obtenus.

Tableau 14 : Intensités des colorations développées en présence d'oxydants

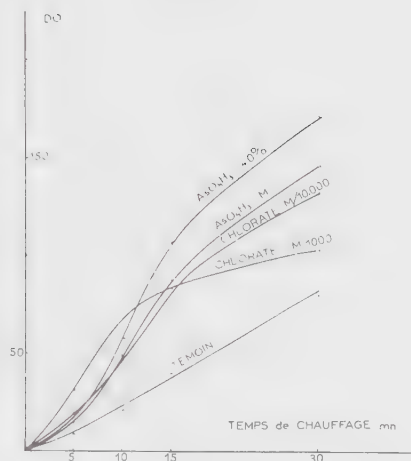
Solutions d'oxydants	M/ 10		M/ 100		M/ 1000	
	SO ₄ H ₂	PO ₄ H ₃	SO ₄ H ₂	PO ₄ H ₃	SO ₄ H ₂	PO ₄ H ₃
Témoin sans oxydant	0,30	0,32	0,30	0,32	0,30	0,32
Arséniate de sodium	0,26	0,40	0,35	0,36	0,33	0,38
Nitrate de sodium	0,67	0,48	0,42	0,42	0,35	0,38
Chlorate de potassium	0,08	0,07	0,12	0,10	0,27	0,65
Chloramine T	0,30	0,27	0,30	0,34	0,35	0,40
Persulfate de potassium	0,32	0,10	0,37	0,35	0,36	0,46
Acide arsénique	0,68	0,32	0,50	0,33	0,35	0,32

C'est en pensant améliorer la réaction en présence de SO₄H₂ que nous avons utilisé cet acide dans nos essais, malgré l'infidélité des résultats que nous avons signalée (page 27).

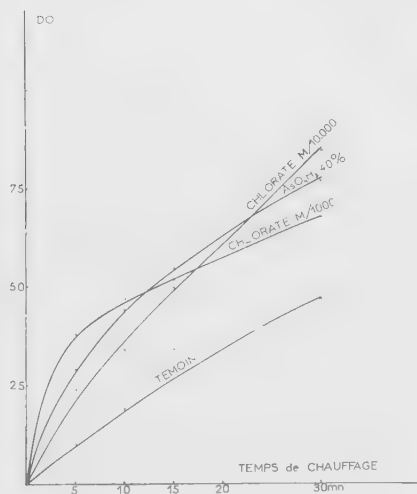
Il ressort du tableau précédent que :

- en présence de PO₄H₃, nitrate et arséniate ont une légère action favorisante aux trois concentrations utilisées. La chloramine et surtout le chlorate favorisent la réaction lorsqu'ils sont en faible quantité, et au contraire l'inhibent à plus forte concentration.

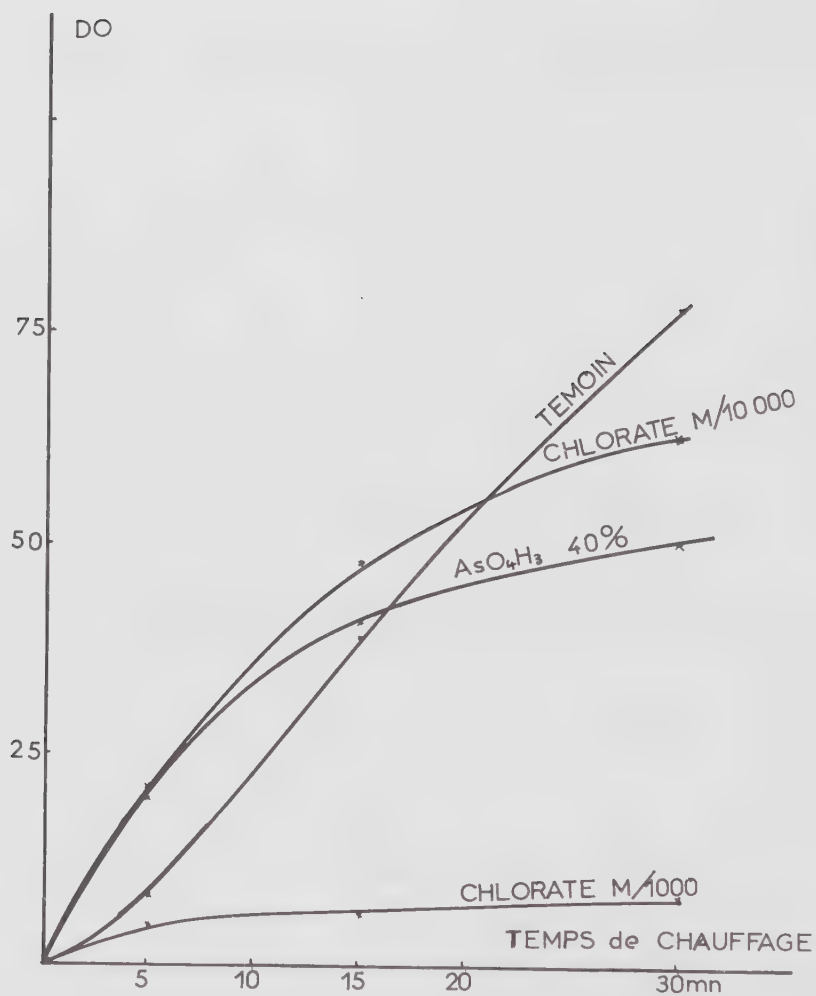
Le graphique 10 met en évidence le rôle des oxydants sur la cinétique de la réaction.



Graphique 10. Réaction urée-diacétylmonoxime
Influence des oxydants ajoutés avant chauffage (milieu phosphorique)



Graphique 11. Réaction urée-diacétylmonoxime
Influence des oxydants ajoutés avant chauffage (milieu sulfurique)



Graphique 11 bis. Réaction urée-diacétylmonoxime
Influence des oxydants ajoutés avant chauffage (milieu sulfurique)

- en présence de SO_4H_2 , il ressort du tableau 14 que deux oxydants sont nettement favorables : nitrate, acide arsénique.

Nous connaissons déjà l'effet de AsO_4H_3 à forte dose.

Mais suivant l'acide sulfurique utilisé, cette amélioration est quantitativement très différente (graphiques 11 et 11 bis) en raison de l'intensité propre de la réaction avec SO_4H_2 . A tel point que si, avant 15 minutes de chauffage, il y a intensification dans les deux cas, par maintien au bain-marie bouillant, la coloration continue à s'intensifier quand SO_4H_2 s'est montré peu actif, et au contraire est plus faible quand SO_4H_2 est très actif.

Il ne semble pas exact de dire que l'acide sulfurique actif contient un oxydant, parce que SO_4H_2 à chaud est lui-même oxydant et parce que la cinétique de la réaction n'est pas la même avec SO_4H_2 et avec SO_4H_2 + oxydants.

Nous nous contenterons de constater à nouveau que SO_4H_2 est un réactif infidèle.

En milieu chlorhydrique, seules les réactions colorées développées en présence d'acide arsénique étaient plus intenses. Ce milieu semble donc donner des réactions moins sensibles à l'action des oxydants.

II - OXYDANTS AJOUTES APRES LE CHAUFFAGE

La réaction est pratiquée sur 60 μg d'urée avec les mêmes acides et les mêmes oxydants que précédemment.

1) En milieu sulfurique (2 ml SO_4H_2 à 50 %)

Tableau 15 : Intensités des colorations obtenues en milieu sulfurique en présence d'oxydants ajoutés après chauffage

	Temoin sans oxydant	Acide arsénique		Chloramine	Chlorate de K	Persulfate de Na	Nitrate		Arséniate
		M	M/10				M	M/1000	
1ère lecture après 10 minutes	0,82	0,83	0,82	2,27	0,98	0,94	0,90	0,80	0,83
2ème lecture après 12 heures	0,90	1,19	0,97	2,23	0,18	1,34	0,99	0,86	0,88

La chloramine se révèle extraordinairement active : l'intensification est considérable et se maintient stable même pendant 12 heures. Cet oxydant a d'ailleurs été choisi par GIRARD et DREUX (1958) pour sensibiliser cette réaction de l'urée.

Le persulfate de sodium améliore nettement la réaction comme le chlorate de potassium. Dans le premier cas, la réaction s'intensifie avec le temps, dans le deuxième, elle s'affaiblit beaucoup.

AsO_4H_3 , arséniate et nitrate ne présentent aucun intérêt.

2) En milieu chlorhydrique

Seuls AsO_4H_3 et le chlorate ont montré une activité qui se limite d'ailleurs à une très faible intensification.

3) En milieu phosphorique

Tableau 16 : Intensités et stabilités des colorations obtenues en milieu phosphorique en présence d'oxydants ajoutés après le chauffage

	Témoin sans oxydant	Acide arsénique		Chloramine	Chlorate	Persulfate	Nitrate		Arséniate
		M	M/10	M/1000	M/1000	M/1000	M	M/1000	M
1ère lecture après 10 minutes	0,63	0,60	0,65	2,5	0,64	1,05	0,61	0,59	0,54
2ème lecture après 12 heures	0,76	0,90	0,85	2,5	1,27	2,55	0,87	0,76	0,72

- on retrouve ici la remarquable intensification par la chloramine, et son excellente stabilité (graphique 12).

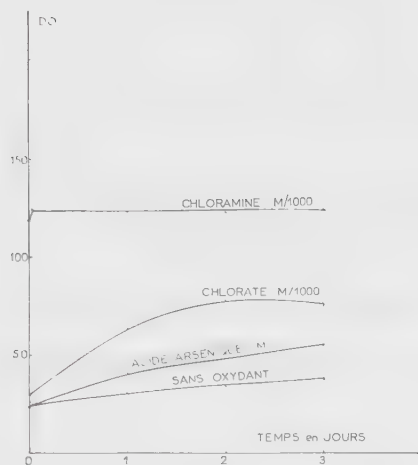
- . l'inactivité de AsO_4H_3 , arséniate et nitrate
- . l'intensification importante apportée par le persulfate

- on remarque le comportement différent du chlorate, dont l'action se manifeste tardivement, évolue lentement et se stabilise (graphique 12).

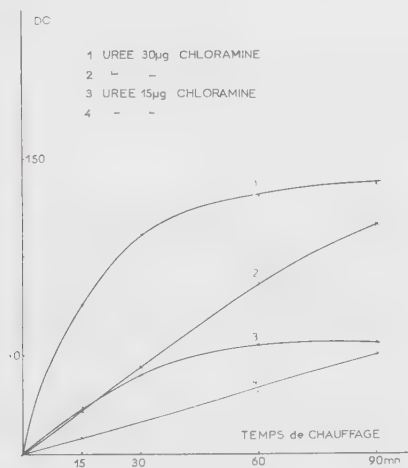
De l'étude générale dans trois milieux acides de l'influence des oxydants ajoutés après le chauffage, il ressort que la chloramine est remarquablement active. Ce composé proposé par GIRARD et DREUX (1958) en milieu sulfurique, méritait d'être étudié en milieu phosphorique, milieu acide de manipulation plus aisée et donnant des résultats supérieurs et plus réguliers.

Etude particulière de la chloramine en milieu phosphorique

Dans un premier essai nous avons voulu préciser s'il convenait d'ajouter l'oxydant immédiatement après le chauffage ou après le refroidissement de mélanges réactionnels.



Graphique 12. Réaction urée-diacétylmonoxime
Stabilité en présence d'oxydants ajoutés après chauffage (milieu phosphorique)



Graphique 13. Réaction urée-diacétylmonoxime
Cinétique après addition de chloramine 0,5 ml M/1000 (milieu phosphorique)

L'intensité des colorations obtenues est :

Témoin sans chloramine (contenant 30 μ g d'urée)	19
Avec chloramine 0,5 ml M/1000	
- ajoutée immédiatement	111
- ajoutée après refroidissement de 5 minutes	32

L'addition de chloramine augmente donc toujours l'intensité de la coloration mais cette augmentation est faible si le mélange réactionnel a été refroidi tandis qu'elle est considérable dans le premier cas.

Concentration optima de chloramine

Tableau 17 : Intensité des colorations en fonction de la quantité de chloramine

Urée M/1000	0,5 ml					1 ml					2 ml				
Chloramine M/500 ml	0,2	0,4	0,6	0,8	1	0,2	0,4	0,6	0,8	1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
BMB 15 mn	0,48	0,51	0,50	0,46	0,45	0,89	1,21	1,22	1,23	1,14	1,12	1,47	1,86	2,07	2,08
30 mn	0,56	0,72	0,71	0,68	0,63	1,20	1,51	1,48	1,46	1,41	1,47	1,81	2,04	2,16	2,15

Nous voyons que la concentration optima en chloramine, quelle que soit la concentration en urée ou le temps de chauffage, est située entre 0,4 et 0,6 ml de solution M/500. Nous retiendrons donc pour la pratique courante 1 ml d'une solution M/1000.

L'influence de cette quantité choisie de chloramine sur le développement de la réaction colorée en présence de deux doses d'urée est représentée sur le graphique 13. On y voit la valeur exacte de l'intensification lorsque cet oxydant est ajouté après des temps de chauffage allant de 15 à 90 minutes. La chloramine a un effet remarquable : elle est plus active sur les colorations insuffisamment développées.

III - INFLUENCE DE REDUCTEURS AJOUTES AVANT LE CHAUFFAGE

Ces essais ont été effectués simultanément avec ceux des oxydants et dans les mêmes conditions. Ont été examinés les composés suivants :

- nitrite de sodium R-P
- sulfite de sodium R-P
- oxalate d'ammonium R-P
- hydroxylamine chlorhydrate R-P

En solutions M/10, le nitrite et à un degré moindre le sulfite et l'hydroxylamine sont inhibiteurs en milieu sulfurique et phosphorique. L'oxalate n'influence pas les colorations. En solutions M/1000 on ne note plus d'activité de ces composés.

Nous avons fait remarquer dans l'introduction de ce chapitre le rôle attribué à l'hydroxylamine, les oxydants n'étant introduits que pour compenser le pouvoir réducteur de ce composé

Nous avons voulu vérifier cette affirmation et les résultats obtenus avec 60 μg d'urée sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 18 : Intensité et stabilité des colorations en présence d'hydroxylamine

	Milieu sulfurique			Milieu arsénicosulfurique		
	0	1	2	0	1	2
Hydroxylamine M/10 ml						
Première lecture	0,42	0,30	0,16	0,56	0,44	0,37
Après 30 mn à l'obscurité	0,42	0,31	0,17	0,56	0,44	0,37
Après 3 h à la lumière	0,07	0,08	0,17	0,22	0,26	0,27

On remarque que :

- l'hydroxylamine inhibe le développement des réactions colorées en fonction de sa concentration et même en présence d'acide arsénique
- AsO_4H_3 ajouté dans le milieu ne lève pas cette inhibition. Ce résultat a été vérifié avec d'autres oxydants comme le chlorate ou le persulfate
- l'hydroxylamine améliore la photostabilité.

CONCLUSION

L'influence des oxydants a été recherchée dans deux sortes de conditions : avant ou après développement de la réaction colorée.

Dans le premier cas, en milieu phosphorique, la réaction est intensifiée par le nitrate et l'arséniate, et à plus faible concentration par la chloramine et le chlorate. En milieu sulfurique, la réaction est intensifiée par le nitrate et l'acide arsénique. L'action favorable de l'acide arsénique est seulement rappelée ici puisque son étude faite au premier chapitre a conduit à l'adoption d'un réactif arsénicosulfurique. C'est son renom d'oxydant qui nous a incité à le placer encore ici. BEALE et CROFT (1961) attribuèrent cette propriété à la présence du nitrate comme impureté. Mais le nitrate ne favorise la réaction qu'à forte dose comme nous l'avons montré. En tous cas, l'arséniate, qui a le même potentiel oxydant propre que l'acide arsénique n'a pas son activité ; il s'agirait donc bien d'une autre substance que l'acide arsénique.

Il est rappelé aussi que la nature de l'acide sulfurique utilisé, intervient dans la réaction qui n'est donc pas fidèle. Par contre l'addition d'acide arsénique à cet acide élimine cet inconvénient.

Dans le deuxième cas (c'est-à-dire après chauffage), on note une action intensifiante considérable de la chloramine aussi bien en milieu phosphorique qu'en milieu sulfurique, et cette intensification présente l'avantage de se stabiliser. De plus, en présence d'acide sulfurique et d'acide phosphorique, la réaction est intensifiée par le persulfate et le chlorate. Mais ce dernier composé n'agit que très lentement en milieu phosphorique.

La chloramine, préconisée en présence d'acide sulfurique, est donc à retenir aussi, en présence d'acide phosphorique. Mais le fait d'ajouter encore un réactif après le chauffage est une manipulation supplémentaire que nous avons préféré éviter dans les réactions que nous proposerons.

Les substances oxydantes peuvent donc être inhibitrices ou activatrices. Deux facteurs permettent d'avoir l'une ou l'autre de ces actions :

- la concentration des oxydants dans le mélange réactionnel
- le temps de chauffage

Ces résultats démontrent qu'on ne peut définir une intensification ou une inhibition de ces réactions colorées sans préciser la cinétique. En effet les substances oxydantes dans une première phase accélèrent le développement des réactions qui sont donc plus intenses. Puis dans une seconde phase les réactions sont bloquées et sont donc moins intenses que celles qui continuent à se développer en l'absence d'oxydants.

Les réducteurs dont fait partie l'hydroxylamine, produit d'hydrolyse de la diacétylmonoxime, inhibent la réaction colorée de l'urée, Mais l'inhibition due à l'hydroxylamine n'est pas levée par addition d'oxydants.

B - SELS METALLIQUES

Avant l'utilisation des sels ferriques (RICHTER et LAPOINTE 1962) comme oxydant, l'action des anions et des cations sur la réaction colorée avait été peu étudiée. Il avait été noté que l'intensification de la coloration augmente en présence de chlorure de sodium (CROKAERT et SCHRAM 1958) et que les ions citrate ou phosphate étaient capables de remplacer l'effet "tampon" et stabilisant de l'acide arsénique (BEALE et CROFT 1961). Signalons d'ailleurs l'usage de chlorure de sodium dans les méthodes adaptées à l'autoanalyseur (mais l'augmentation de la coloration obtenue ici est due à une modification de la vitesse de dialyse).

Les métaux interfèrent dans la réaction colorée. Dès la mise au point de la réaction, FEARON (1939) avait reconnu que le cuivre est inhibiteur. Des traces de métaux semblaient nécessaires à l'activité de SO_4H_2 (RATNER 1955, MAN-NING et GRISOLIA 1957). Le manganèse, le cuivre et l'antimoine stabilisaient la réaction colorée (BEALE et CROFT 1961).

Enfin des métaux furent préconisés comme oxydants : cerium (MARSH et coll. 1957), Fe^{+++} (RICHTER et LAPOINTE 1962). Très récemment l'action de ces métaux sur la cinétique a été mise en évidence (CERIOTTI et SPANDRIO 1965) alors que nous mêmes avions déjà observé ces effets.

Avant d'entreprendre l'étude particulière des métaux, nous avons voulu tester l'influence, en général, des anions et des cations minéraux et organiques. Pour cela nous avons introduit dans la réaction colorée des ions monovalents, bivalents, trivalents, pour tenter de mettre en évidence une influence éventuelle de la charge électrique. Nous avons également vérifié l'effet d'ions de volume croissant (fluorure, chlorure, bromure, iodure). Voici les composés étudiés :

- Acétate de sodium
- Borate de sodium
- Bromure de potassium
- Carbonate monoacide de sodium
- Carbonate neutre de sodium
- Chlorure de calcium
- Chlorure de magnésium
- Chlorure de potassium
- Chlorure de sodium
- Fluorure de sodium
- Iodure de potassium
- Oxalate neutre d'ammonium
- Phosphate monosodique
- Citrate de sodium
- Sulfate de sodium
- Tartrate double de sodium et potassium
- Chlorure d'ammonium

Ces composés testés en solutions M/10, M/100 et M/1000 n'influencent pas les réactions colorées développées en milieu sulfurique, phosphorique et arsénicosulfurique. La charge électrique des anions et des cations et le volume atomique n'interfèrent donc pas. Nous n'avons donc pas retrouvé l'action signalé par CROKAERT et SCHRAM (1958) avec Cl Na.

Seuls les iodures, mais dans certains essais seulement, donnaient des colorations plus intenses (non dues à une libération d'iode dans le milieu).

Cette observation n'étant pas constante nous ne pouvons qu'attirer l'attention sur les risques d'interférence des iodures.

I - RECHERCHE DES EFFETS EVENTUELS DE DIVERS SELS METALLIQUES

Dans une première série d'essais nous avons testé en milieu phosphorique et sulfurique les métaux suivants (à la dose de 0,5 ml de solutions M/10, M/1000 et M/100 000) :

- Argent (nitrate)
- Cadmium (sulfate)
- Cuivre (sulfate)
- Fe^{++} (sel de Mohr)
- Fe^{+++} (alun de fer)
- Manganèse (sulfate)
- Nickel (sulfate)
- Zinc (sulfate)
- Cobalt (nitrate)

Les résultats obtenus sont :

. avec des solutions M/10

- en milieu phosphorique

- une augmentation nette des colorations en présence de Fe^{+++} et de cuivre
- une action moins intense du manganèse et de l'argent
- une inhibition par le Fe^{++}
- le zinc, le nickel, le cobalt et le cadmium sont inactifs.

- en milieu sulfurique

- une intensification très nette par l'argent (six fois)
- une intensification nette avec le cuivre (deux fois et demie)
- une action intensifiante légère de Fe^{++} , du manganèse
- le zinc, le cobalt et le Fe^{+++} sont inactifs.

. avec des solutions M/1000

- en milieu phosphorique, une action intensifiante légère du Fe^{+++} du manganèse et du cuivre. Les autres métaux sont sans action.

. en milieu sulfurique

- une intensification par le Fe^{+++} (quatre fois)
- et plus faiblement par le Fe^{++} (deux fois)

. avec des solutions M/100 000, aucun métal étudié n'influence la réaction colorée dans les deux milieux acides testés.

Les métaux actifs sont donc le fer, le cuivre, le manganèse et l'argent.

Influence de quelques sels métalliques

En raison des difficultés d'interprétation des résultats en milieu sulfurique, nous avons abandonné cet acide et nous avons préféré poursuivre nos essais en milieu chlorhydrique. Nous avons ainsi, avec cet acide fort, des points de comparaison avec l'acide phosphorique. Le zinc, le nickel, le cobalt et le cadmium qui étaient sans action dans les essais précédents n'ont plus été étudiés de même l'argent parce que précipitant dans le milieu. Cependant, nous avons noté son action intensifiante dans l'essai précédent.

Voici le protocole opératoire suivi :

	- Urée M/1000	0,5 ml (30 μg)
	- HCl	1,25 ml
ou	$\text{PO}_4 \text{H}_3$	2,5 ml
ou	Acide paratoluènesulfonique 50 %	2,5 ml
ou	Acide sulfosalicylique 60 %	3 ml
	- Diacétylmonoxime M/10 (M/2 avec acide paratoluènesulfonique)	1 ml
	- Solutions de sels métalliques M/10, M/100, M/1000 ..	0,5 ml

pour un volume total de 6 ml

Pour saisir au mieux l'interférence des ions métalliques dans cette réaction colorée, chaque concentration du métal était essayée avec deux temps de chauffage (10 à 30 minutes de bain-marie bouillant).

Nous avons vérifié que les colorations sont stables au moins trois heures à l'obscurité, que l'absorption propre des solutions métalliques n'interfère pas, et que les quantités d'acide et de réactif diacétylmonoxime définies précédemment comme optima ne sont pas modifiées du fait de la présence de sels métalliques.

1) Milieu chlorhydrique

Tableau 19 : Influence des métaux sur l'intensité des colorations en milieu chlorhydrique

BMB	concentration des solutions métalliques	Témoin sans métal	Cuivre	Fe ⁺⁺	Fe ⁺⁺⁺	Manganèse
- 10 mn	M/10	0,19	0,02	0,26	0,06	0,22
	M/100	0,19	0,03	0,22	0,03	0,21
	M/1000	0,19	0,20	0,22	0,29	0,19
- 30 mn	M/10	0,54	0,02	0,28	0,05	0,64
	M/100	0,54	0,03	0,55	0,04	0,63
	M/1000	0,54	0,21	0,62	0,55	0,63

De l'examen de ce tableau il ressort que :

- le cuivre est nettement inhibiteur, sauf à la concentration M/1000 après 10 minutes de chauffage pour laquelle il y a un arrêt de développement de la coloration malgré la prolongation du chauffage

- le Fe⁺⁺⁺ est également inhibiteur, en remarquant toutefois qu'après 10 minutes de chauffage la faible concentration M/1000 est légèrement intensifiante ; après 30 minutes cet avantage est perdu

- le manganèse est pratiquement inactif

- le Fe⁺⁺ est légèrement intensifiant pour un chauffage de 10 minutes.

Après 30 minutes il apparaît sans action à la concentration M/1000 et nettement inhibiteur aux concentrations M/100 et M/10.

2) Milieu phosphorique

Tableau 20 : Influence des métaux sur l'intensité des colorations en milieu phosphorique

BMB	concentrations des solutions métalliques	Témoin sans métal	Cuivre	Fe ⁺⁺	Fe ⁺⁺⁺	Manganèse
- 10 mn	M/10	0,10	0,18	0,01	0,25	0,11
	M/100	0,10	0,16	0,03	0,29	0,12
	M/1000	0,10	0,12	0,10	0,13	0,10
- 30 mn	M/10	0,47	0,49	0,02	0,40	0,63
	M/100	0,47	0,59	0,19	0,75	0,57
	M/1000	0,47	0,51	0,60	0,60	0,54

De l'examen de ce tableau il ressort que :

- le cuivre est nettement intensifiant - après 10 minutes de chauffage l'intensification augmente avec la concentration
- après 30 minutes de chauffage la concentration M/100 paraît la plus favorable
- le Fe⁺⁺⁺ est encore plus intensifiant que le cuivre. Avec les deux temps de bain-marie essayés, la concentration M/100 est la plus active
- le Fe⁺⁺ est fortement inhibiteur aux concentrations M/10 et M/100. A la concentration M/1000, il est sans action pour le chauffage de 10 minutes, légèrement intensifiant après 30 minutes.
- le manganèse est sans action pour 10 minutes de chauffages. Il est intensifiant à 30 minutes, et d'autant plus que la concentration est plus élevée.

3) Milieux sulfosalicylique et paratoluènesulfonique

- En milieu sulfosalicylique on ne note jamais d'intensification. Le cuivre pour les trois concentrations testées, est inhibiteur, sans modification importante de la cinétique. Par contre le Fe⁺⁺ semble avoir une légère action sur le développement de la réaction colorée en fonction du temps de chauffage.

- En milieu paratoluènesulfonique le Fe⁺⁺⁺ devient inhibiteur à concentration élevée et aucun sel métallique ne montre une action d'intensification dans ce milieu.

Les sels métalliques sont donc faiblement actifs en présence des acides sulfosalicylique ou paratoluènesulfonique, et ne permettent pas d'améliorer les qualités de ces acides.

En résumé, cette étude préliminaire des métaux met en évidence une action nette du cuivre et du Fe^{+++} en milieu chlorhydrique et phosphorique, et une action moins marquée et plus diversifiée de Fe^{++} en milieu phosphorique.

Nous avons essayé de préciser les doses exactes de solutions métalliques entraînant les effets observés.

II - ETUDE PARTICULIERE DE L'INTERVENTION DES SELS METALLIQUES DANS LA CINETIQUE DE LA REACTION

Nous avons examiné l'influence de solutions de sels métalliques à des concentrations diverses, sur le développement des colorations obtenues par des temps de chauffage variant de 10 à 60 minutes.

Les graphiques 14, 15 et 16 correspondent aux résultats obtenus avec le Fe^{+++} , le Fe^{++} et le cuivre (0,5 ml de solution) ajouté avant le chauffage, aux réactions développées par 30 μg d'urée en milieu chlorhydrique, et les graphiques 17, 18 et 19 à ceux obtenus avec le Fe^{+++} , le cuivre et le manganèse en milieu phosphorique. On remarque la grande similitude des tracés : les métaux à l'exception du manganèse, accélèrent le développement de la réaction colorée dans une première phase, puis l'arrêtent. Le manganèse au contraire ne modifie pas la cinétique : les colorations sont toujours plus intenses.

Les modifications de la cinétique des colorations, accélération au départ puis stabilisation rapide, se traduisent donc suivant les temps de bain-marie bouillant choisis par une action d'intensification ou d'affaiblissement. Ces résultats très importants confirment qu'on ne peut définir une action d'intensification sans étudier la cinétique de la réaction.

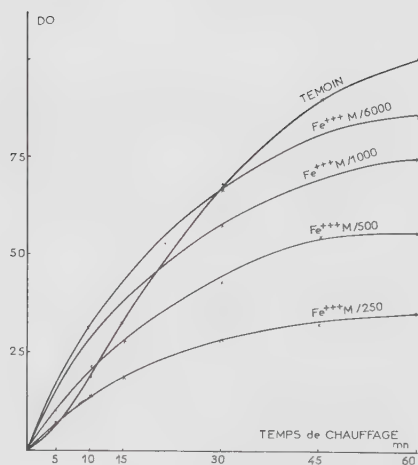
Cette action intensifiante peut-être obtenue :

a) pour les temps de chauffage courts seulement :

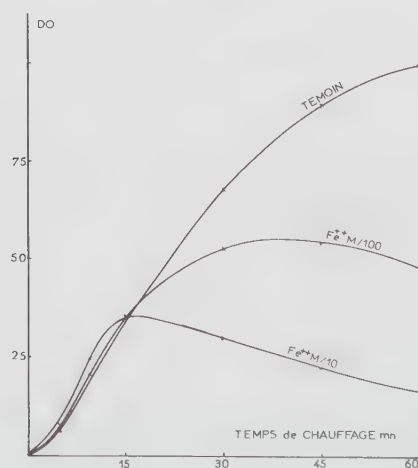
- en milieu phosphorique avec le cuivre M et M/10
le Fe^{+++} M/2 et M/10
- en milieu chlorhydrique avec le cuivre M/500 et M/5000
le Fe^{+++} M/250 à M/1000
le Fe^{++} M/10

b) pour tous les temps de bain-marie bouillant

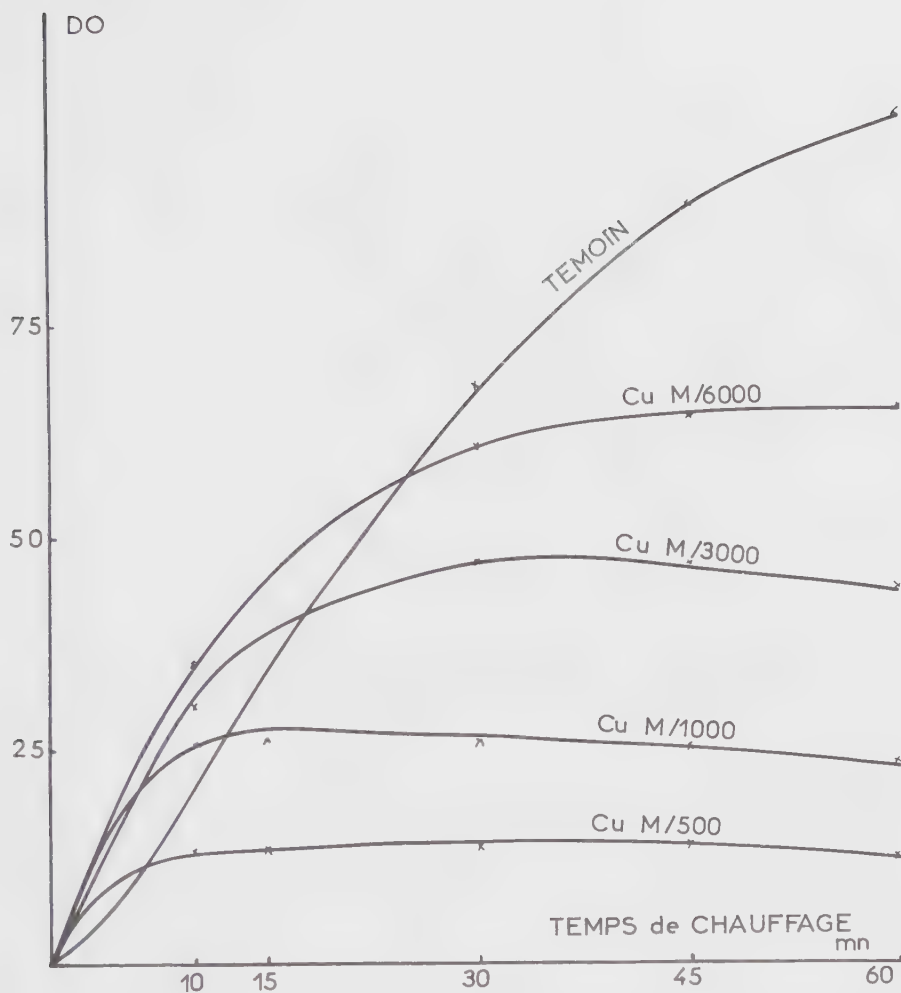
- en milieu phosphorique avec le cuivre M/100
le Fe^{+++} M/100 à M/1000
le manganèse M/10 à M/1000



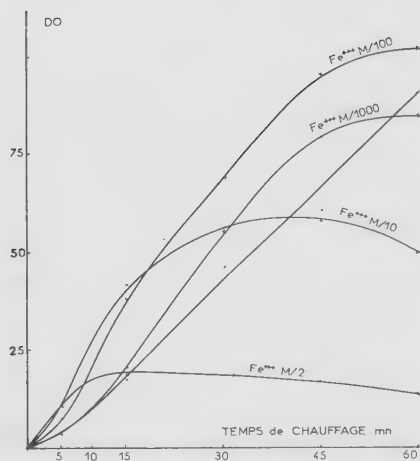
Graphique 14. Réaction urée-diacétylmonoxime
Cinétique en milieu chlorhydrique en présence de sel ferrique



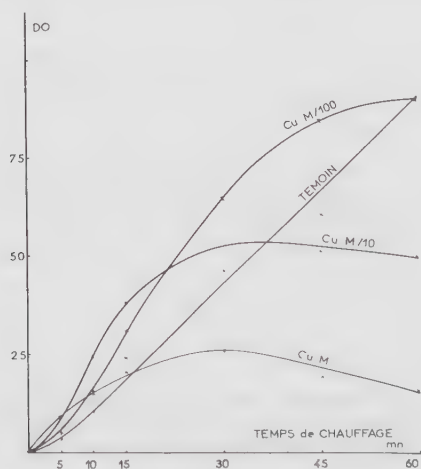
Graphique 15. Réaction urée-diacétylmonoxime
Cinétique en milieu chlorhydrique en présence de sel ferreux



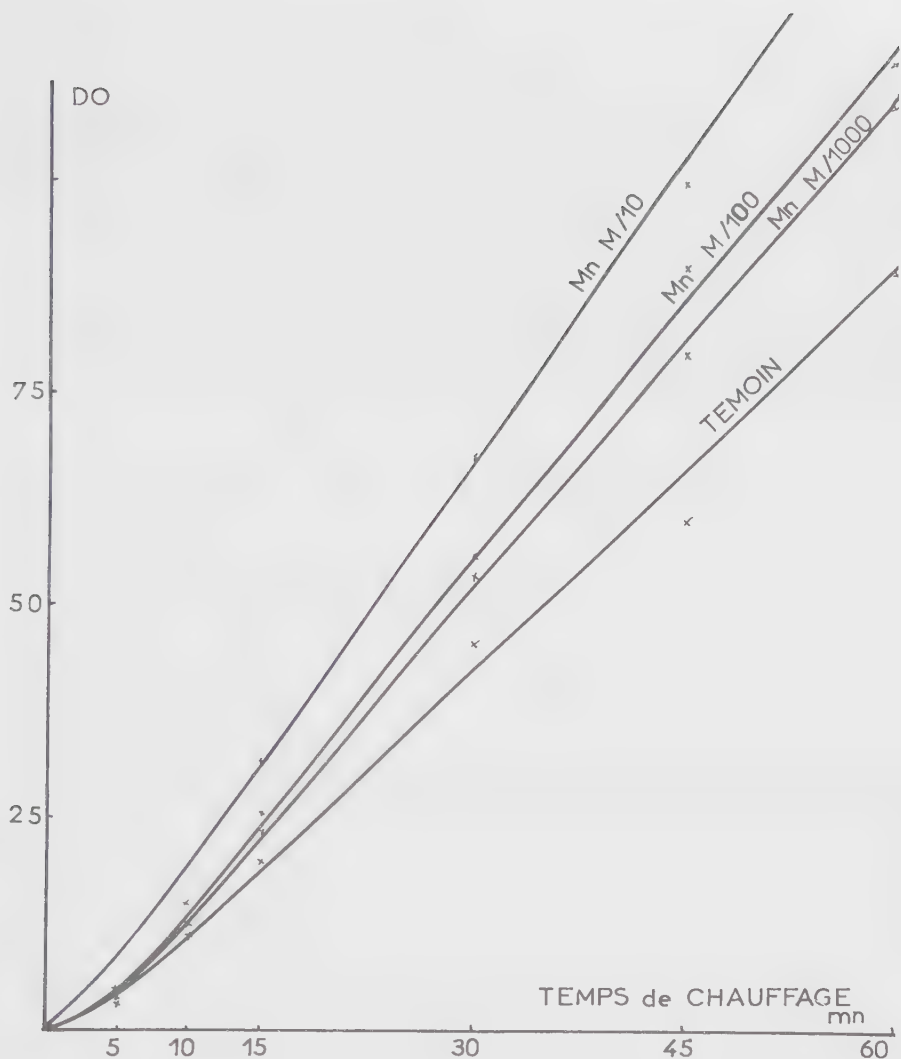
Graphique 16. Réaction urée-diacétylmonoxime
Cinétique en milieu chlorhydrique en présence de sel cuivrique



Graphique 17. Réaction urée-diacétylmonoxime
Cinétique en milieu phosphorique en présence de sel ferrique



Graphique 18. Réaction urée-diacétylmonoxime
Cinétique en milieu phosphorique en présence de sel cuivrique



Graphique 19. Réaction urée-diacétylmonoxime
Cinétique en milieu phosphorique en présence de manganèse

Les concentrations des sels métalliques les plus actives sont donc très différentes d'un milieu acide à l'autre : il faut des concentrations dix à cent fois supérieures pour modifier les caractères des réactions en milieu phosphorique par rapport au milieu chlorhydrique. Dans ce dernier milieu, le Fe^{+++} par exemple, est encore actif lorsqu'il est ajouté à la dose de $5 \mu\text{g}$ ($0,5 \text{ ml}$ de solution $\text{M}/6000$). Il est donc possible de concevoir une interférence éventuelle de ces composés à titre d'impuretés. C'est une raison supplémentaire pour préférer le milieu phosphorique qui permet le développement de colorations moins sensibles aux métaux.

Nous avons vérifié avec le fer en milieu phosphorique et le cuivre en milieu chlorhydrique, que les métaux ne modifiaient pas les autres paramètres de la réaction : quantités d'acides et de diacétylmonoxime définies aux chapitres premier et deuxième.

CONCLUSION

De cette étude de l'interférence des métaux, il est possible de conclure que l'activité principale du fer et du cuivre, métaux les plus actifs sur les réactions urée-diacétylmonoxime se résume à une modification de la cinétique des réactions colorées. On peut comparer leur action à celle des catalyseurs : ils permettent de réduire la durée du chauffage tout en donnant des colorations entièrement développées. Il y a lieu de remarquer toutefois que dans tous les cas, cette action s'accompagne d'une perte de sensibilité puisque la réaction est stoppée.

Le cuivre en solution M/500 en milieu chlorhydrique et le fer ferrique en solution M/2 en milieu phosphorique donnent les résultats les plus intéressants.

Suite à ces résultats, nous sommes donc parvenu à un des buts recherchés : modification par addition de fer, de la cinétique des réactions développées en milieu phosphorique.

Nous proposons dans la quatrième partie de ce travail une technique de dosage avec un réactif phosphoferrique :

- $\text{Fe Cl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$ 4 g
- Eau distillée 75 ml
- PO_4H_3 125 ml

Ce réactif est utilisé à la dose de 4 ml pour 6 ml de volume total et permet un développement complet des colorations en 8 minutes de bain-marie bouillant.

C - SOLVANTS ORGANIQUES

Nous avons été amené à utiliser des solvants organiques pour dissoudre certaines oximes insolubles dans l'eau, en particulier les dioximes du diacétyle et de la phénylpropanedione. C'est ainsi que nous avons dû étudier leur action interférente favorable ou défavorable.

Avant nous, l'éthanol ou le dioxane avaient été préconisés pour stabiliser les colorations après leur développement (WHEATLEY 1948, CROKAERT et SCHRAM 1958, GERHART et PARDEE 1962). L'activité de l'éthanol est contreversée : affaiblissement pour certains, stabilisation partielle pour d'autres. Quant à l'acétone, elle a été essayée comme diluant après le refroidissement du mélange réactionnel (WHEATLEY 1948).

I - INFLUENCE DES ALCOOLS

Pour apprécier l'action éventuelle des alcools nous les avons ajoutés dans la réaction à la diacétylmonoxime à la dose de 0,2 ml, en milieu arsénicosulfurique et phosphorique.

Tableau 21 : Intensités des colorations dans la réaction urée-diacétylmonoxime, en présence d'alcools

	Témoin sans alcool	Méthanol	Ethanol	Propanol	Butanol	Ethylène- glycol
Milieu arsénicosulfurique	0,67	0,65	0,57	0,43	0,68	0,67
Milieu phosphorique	1,06	0,90	0,78	0,30	1,02	1,04

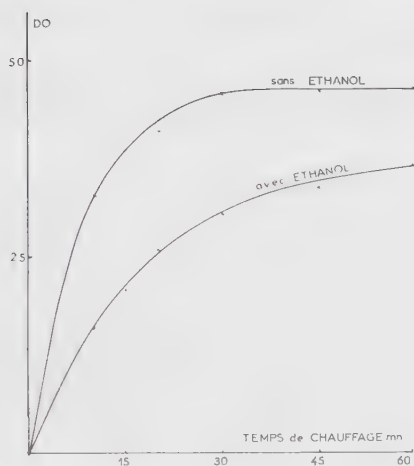
On constate une action inhibitrice croissante dans l'ordre : méthanol - éthanol - propanol ; aucun effet de l'éthylène glycol, ni du butanol.

L'action inhibitrice se manifeste quel que soit le temps de chauffage (graphique 20).

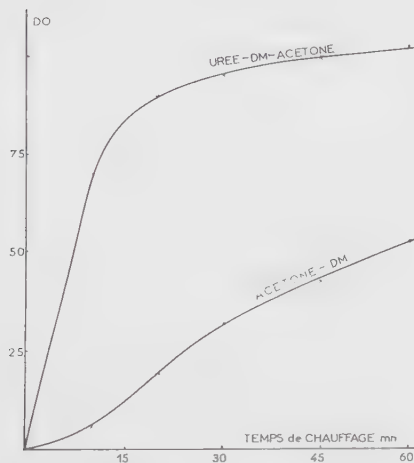
II - INFLUENCE DE CETONES ET ETHERS

Dans les mêmes conditions l'acétone, la butanone, la méthylisobutylcétone, le méthylal et le dioxane perturbent les réactions colorées urée-diacétylmonoxime.

- soit en donnant des colorations avec les acides en solutions trop concentrées



Graphique 20. Réaction urée-diacétylmonoxime
Cinétique en milieu arsénicosulfurique en présence d'éthanol



Graphique 21. Réaction urée-diacétylmonoxime
Cinétique en milieu phosphorique en présence d'acétone et
cinétique de la réaction acétone-diacétylmonoxime

- soit en développant une coloration parasite par réaction avec la diacétylmonoxime, en l'absence d'urée.

Ces colorations sont plus intenses en milieu sulfurique que phosphorique et leur intensité est proportionnelle au temps de chauffage.

- soit enfin en augmentant ou en diminuant l'intensité de la coloration urée-diacétylmonoxime.

Le méthylal même à faible concentration (0,6 ml de solution M) inhibe totalement la réaction colorée. Les autres solvants (0,2 ml de solvant) sont partiellement inhibiteurs, à l'exception de l'acétone. L'acétone, dans un milieu phosphorique plus concentré que celui précédemment défini est capable de très nettement intensifier les colorations urée-diacétylmonoxime. Nous avons voulu préciser cette action.

Etude particulière de l'influence de l'acétone

Nous avons constaté que l'action de l'acétone sur la réaction colorée est d'autant plus importante que l'acidité du milieu est élevée. L'intensité de la réaction parasite acétone-diacétylmonoxime est d'ailleurs proportionnelle aussi à cette acidité. Dans nos conditions habituelles nous avons retenu comme quantité d'acide moyenne conciliant ces deux réactions : 3,5 ml de PO_4H_3 .

L'intensité des colorations en fonction de la quantité d'acétone introduite dans le mélange habituel est reportée dans le tableau suivant correspondant à une réaction développée sur 30 μg d'urée, en présence de 3,5 ml de PO_4H_3 , bain-marie bouillant 10 minutes.

Tableau 22 : Intensité des colorations en fonction de la quantité d'acétone

		Témoin sans urée				Urée 30 μg					
Acétone	ml	0	0,2	0,6	1	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
D.O.		0	0,03	0,08	0,19	0,11	0,60	0,67	0,69	0,72	0,82

On constate que la réaction est intensifiée plus de cinq fois avec 0,2 ml d'acétone (D.O. = 0,11 passe à 0,60) alors que le témoin solvant est très peu coloré (D.O. = 0,03). Des concentrations supérieures à 0,6 ml n'ont pas d'intérêt, vu l'augmentation de la coloration due au solvant.

Nous avons précisé la cinétique de la réaction acétone-diacétylmonoxime (graphique 21). Nous voyons que la réaction solvant-acétone-diacétylmonoxime

(acétone 0,5 ml - diacétylmonoxime M/10 1 ml - PO_4H_3 3,5 ml pour 6 ml de volume total) se développe encore à 60 minutes de chauffage.

La réaction urée-diacétylmonoxime en présence d'acétone (urée 30 μg , diacétylmonoxime M/10 1 ml, PO_4H_3 3,5 ml, acétone 0,5 ml pour 6 ml de volume total) est stabilisée compte tenu des valeurs de la réaction secondaire acétone-diacétylmonoxime.

Or nous savons que les colorations obtenues en milieu phosphorique ne sont pas encore entièrement développées après 90 minutes de chauffage. L'acétone modifie donc la cinétique des réactions urée-diacétylmonoxime.

L'acétone avec des temps de chauffage courts peut avoir un certain intérêt puisque la coloration parasite est alors très faible. Nous avons essayé de développer les réactions colorées en présence de ce solvant à 37, 45 et 55°. A ces températures, l'acétone conserve son activité sur la réaction urée-diacétylmonoxime alors que les colorations parasites sont pratiquement inexistantes.

En résumé, certains solvants essayés (alcools, cétones, éthers) inhibent la réaction colorée. Cette inhibition doit être connue et définie si on est amené à ajouter certaines substances en solution dans ces solvants.

Il y a une exception, l'acétone. En présence d'une quantité suffisante de PO_4H_3 , nous avons montré que l'acétone apporte une intensification importante. Une réaction parasite de l'acétone avec les réactifs eux-mêmes n'intervient pas lorsque le temps de chauffage est court.

D - DIVERS ADJUVANTS

On voit dans le tableau synoptique (pages 14 à 21) que des substances organiques fort diverses ont été parfois ajoutées dans la réaction. En général la coloration obtenue est nettement plus intense que la coloration habituelle (d'où l'appellation "substances intensifiantes").

WHEATLEY (1948) a le premier cherché à introduire différents composés dans le mélange réactionnel pour intensifier les colorations : il imitait BARRIT (1936) qui avait proposé l'alpha-naphtol pour rendre plus intense la réaction diacétyl-créatine.

Voici les substances ajoutées et les colorations obtenues :

Substances ajoutées dans la réaction	Colorations obtenues
- alpha-naphtol (WHEATLEY 1948)	rouge
- thymol (WHEATLEY 1948)	rouge
- aniline (WHEATLEY (1948)	rouge orangé
- alpha naphtylamine (WHEATLEY 1948)	rouge orangé
- alpha-naphtyldiméthylamine (WHEATLEY 1948)	rouge orangé
- amidopyrine (WHEATLEY 1948)	violet passant au rouge
- diphénylamine (WHEATLEY 1948)	rouge violet
- acide phénylanthranilique (WHEATLEY 1948) (BEALE et CROFT 1961)	rouge orangé
- diphénylamino-p-sulfonate (KORITZ et COHEN 1954) (CROKAERT et SCHRAM 1958) (BEALE et CROFT 1961) (GERHARDT et PARDEE 1962) (DAVIDSON et WINTER 1963)	rouge violet
- 4-amino-diphénylamine (BEALE et CROFT 1961)	rouge
- phénylhydrazine (ELIODI (1954) (MOKLER 1960)	rose et jaune
- thiosemicarbazide (KIDO 1958) (BANCHI et LOMUTU 1960) (COULOMBE et FAVREAU 1963) (MOORE et SAX 1965) (MARSCH et coll. 1965) (FINGERHUT et coll. 1965 et 1966) (HAURY 1965)	rose orangé
- tryptophane (OREKHOVIC et TUSTANOVSKIJ 1949) pourpre (PECHAR et coll. 1954)	
- phénazone (CERIOTTI et SPANDRIO 1963-1965) jaune citron (KULHANEK et coll. 1964) (CERIOTTI et GAZZANIGA 1966)	

- n-phényl-p-phénylenediamine rouge
(HUNNINGHAKE et GRISOLIA 1966)
 - dimedon
 - acide maléique
 - 4-amino-phénazone
- } (CERIOTTI et SPANDRIO 1963) jaune
- glucuronolactone (MOMOSE et coll. 1965) jaune
(COTTE 1966)
 - amide de l'acide glycuronique jaune
(MOMOSE et coll. 1965)

Tous ces composés, à l'exception des cinq derniers, modifient le spectre de la réaction colorée habituelle et donnent des réactions colorées très intenses.

Parmi les substances étudiées, WHEATLEY (1948) retint d'abord l'acide phénylanthranilique qui fut repris ensuite par BEALE et CROFT (1961). Mais l'insolubilité de ce composé lui fit ensuite préférer le diphenylamino-p-sulfonate (KORITZ et COHEN 1954).

L'addition de tryptophane préconisée par OREKHOVIC et TUSTANOVSKIJ (1949) doit être soigneusement définie en fonction de la concentration du dérivé carbamidé (urée ou citrulline) car les colorations obtenues sont par exemple roses si l'urée est en excès, ou jaune pourpre si le tryptophane est en excès.

ELODI (1954) ajoutait le chlorhydrate de phénylhydrazine pour modifier et différencier les colorations de l'urée et de la citrulline qui devenaient respectivement jaune et rose.

Le thiosemicarbazide fut utilisé d'abord par KIDO (1958) puis par BANCHI et LOMUTU (1960) pour révéler avec la diacétyldioxime ou la diacétylmonoxime des dérivés carbamidés provenant de l'oxydation des bases puriques ou pyrimidiques. COULOMBE et FAVREAU (1963) l'introduisirent dans la réaction colorée de l'urée pour remplacer l'acide phénylanthranilique.

De nombreux auteurs à leur suite firent appel au thiosemicarbazide (MOORE et SAX 1965, MARSH W.H. et coll. 1965, FINGERHUT et coll. 1965-1966, HAURY 1965).

Un composé très actif a été proposé par CERIOTTI et SPANDRIO (1963) la phénazone (antipyrine). Ces auteurs pensaient détruire par cette addition l'hydroxylamine formée au cours de l'hydrolyse de la diacétylmonoxime.

Quant à la glucuronolactone elle a été introduite dans la réaction colorée pour la stabiliser (MOMOSE et coll. 1965, COTTE 1966).

De la lecture des publications concernant ces substances intensifiantes une remarque importante se dégage : ces composés donnent en général une coloration propre avec le mélange réactionnel en l'absence d'urée. Il est à noter que SMITH (1935) qui décrit le premier les réactions colorées du diacétyle et de

la diacétyldioxime avec des carbamides, avait également obtenu des réactions positives avec des carbazides, la phénylhydrazine, le phénol, l'aniline et la m-toluidine. Les composés capables d'intensifier la réaction urée-alpha-dicétone, réagissent donc par eux-mêmes avec les dicétones. Il est donc nécessaire de limiter la quantité de ces substances pour n'avoir que des "blancs réactifs" peu colorés.

D'autre part les conditions opératoires décrites sont très différentes, et souvent très complexes car en plus de ces substances intensifiantes certains ajoutent encore d'autres composés : persulfate (WHEATLEY 1948), nitrite (OREKHOVIC 1949), phosphate, nitrate, manganèse (BEALE et CROFT 1961). De plus l'acide le plus fréquemment utilisé dans ces techniques est SO_4H_2 dont nous connaissons les inconvénients.

C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'étudier dans des conditions identiques, les substances les plus actives retenues par les différents auteurs.

I - ETUDE COMPARATIVE DE QUELQUES SUBSTANCES INTENSIFIANTES DANS DIFFERENTS MILIEUX ACIDES

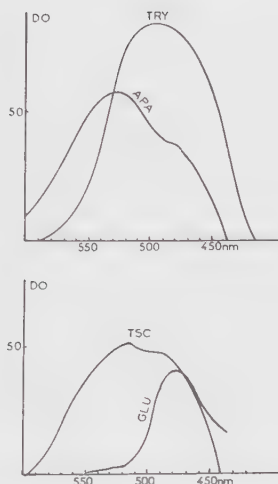
Nous avons étudié l'influence sur les réactions colorées développées dans les conditions précédemment définies des composés suivants qui nous ont donné les colorations ci-dessous (nous avons inscrit entre parenthèses les abréviations que nous utiliserons).

- Acide phénylanthranilique	(APA) : coloration violette
- Diphenylamino-p-sulfonate	(DPS) : coloration violette
- Tryptophane	(TRY) : coloration orangée
- Phénylhydrazine, HCl	(PH) : coloration rose
- Thiosemicarbazide	(TSC) : coloration rose
- Phénazone	(PE) : coloration jaune citron
- Glucuronolactone	(GLU) : coloration jaune

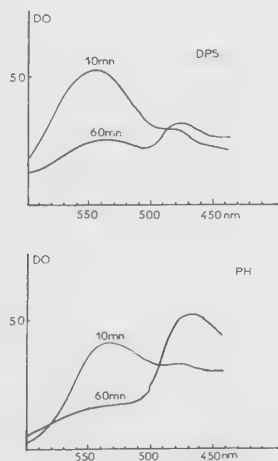
Ces colorations ont été obtenues en milieu arsénicosulfurique avec 0,5 ml de solution M/ 500 de ces composés après 10 minutes de bain-marie bouillant. Lors de ces essais préliminaires, effectués pour vérifier les spectres d'absorption de ces réactions colorées (graphiques 22 et 23) nous avons remarqué que :

- 1) Certains spectres ont deux pics - dont l'un se trouve toujours dans le voisinage du pic habituel de la réaction urée-diacétylmonoxime à 480 nm
- 2) Les spectres évoluent avec le temps de chauffage.

Confirmant les indications bibliographiques sur la couleur obtenue (pages 75 et 76) nous avons constaté que, en présence de phénylhydrazine, les colorations passaient du rose au jaune pendant le chauffage. De même avec le diphenylamino-p-sulfonate la coloration rose virait au violet. Les modifications



Graphique 22. Réaction urée-diacétylmonoxime
Spectres en présence de substances intensifiantes (BMB 10 mn)



Graphique 23. Réaction urée-diacétylmonoxime
Spectres en présence de substances intensifiantes : influence du temps de chauffage

spectrales sont très nettes quand on observe la réaction après 10 minutes de chauffage et après 60 minutes.

Seule la glucuronolactone ne modifie pratiquement pas le spectre des colorations.

Il est donc nécessaire de bien préciser les conditions opératoires choisies et la longueur d'onde à laquelle sont faites les lectures spectrales.

Nous avons opéré dans les conditions optima en acide et en diacétylmonoxime définies aux chapitres précédents. Nous avons ajouté 0,5 ml de solution M/500 de ces composés dans un milieu contenant 15 μ g d'urée. Les lectures ont été effectuées aux longueurs d'onde suivantes (en nm) :

- 480 pour les témoins de réaction colorée habituelle et la glucurone
- 530 pour l'acide phénylanthranilique et le diphénylamino-p-sulfonate
- 525 pour le thiosemicarbazide
- 500 pour le tryptophane
- 460 pour la phénazone
- 470 pour la phénylhydrazine

1) Réactions en milieu arsénicosulfurique

Tableau 23 : Intensité de la réaction colorée développée en milieu arsénicosulfurique en présence de divers "intensifiants"

BMB en mn	10	20	30	60
Témoin	0,10	0,15	0,16	0,18
Acide phénylanthranilique	0,40	0,36	0,28	0,22
Tryptophane	0,38	0,30	0,25	0,17
Thiosemicarbazide	0,72	0,70	0,65	0,58
Phénazone	0,16	0,23	0,27	0,37
Diphénylamino-p-sulfonate	0,56	0,54	0,38	0,28
Diphénylhydrazine	0,13	0,15	0,20	0,40
Glucuronolactone	0,11	0,15	0,17	0,21

A l'exception de la glucuronolactone toutes les substances essayées intensifient la réaction et modifient sa cinétique.

La prolongation du chauffage affaiblit l'intensification obtenue pendant le temps le plus court (10 minutes) avec l'acide phénylanthranilique, le tryptophane, le thiosemicarbazide et le diphénylamino-p-sulfonate.

La phénazone et la phénylhydrazine sont les deux substances pour lesquelles l'intensification augmente avec le temps de chauffage.

Il ne faut pas oublier dans cette interprétation que les longueurs d'onde choisies pour les lectures correspondent à un seul pic.

Dans le cas de la phénylhydrazine, elle correspond au deuxième pic (voir graphique 23) qui n'apparaît que progressivement d'où l'apparente lenteur de développement de la coloration.

Enfin la phénazone utilisée ici en concentration équivalente aux autres intensifiants semble peu active. Nous verrons qu'une plus grande quantité est nécessaire.

2) Réactions en milieu phosphorique

Tableau 24 : Intensité de la réaction colorée développée en présence d' " intensifiants " en milieu phosphorique

BMB en mn	10	30	60
Témoin	0,04	0,17	0,32
Acide phénylanthranilique	0,08	0,13	0,13
Tryptophane	0,04	0,08	0,07
Thiosemicarbazide	0,20	0,36	0,31
Phénazone	0,035	0,28	0,60
Diphénylamino-p-sulfonate	0,12	0,16	0,17
Phénylhydrazine	0,04	0,07	0,05
Glucuronolactone	0,05	0,18	0,30

L'ensemble des résultats met en évidence une intervention beaucoup plus faible dans le milieu phosphorique que dans le milieu arsénicosulfurique.

On note une accélération du développement de la coloration par le thiosemicarbazide et le diphenylamino-p-sulfonate. Dans le premier cas, la coloration s'intensifie à 30 minutes puis se stabilise à une valeur égale à celle du témoin. Dans le deuxième cas, la coloration obtenue en 10 minutes est stoppée dans son évolution ultérieure si bien qu'à 60 minutes, elle est inférieure à celle du témoin.

La glucuronolactone n'améliore pas la coloration.

Tryptophane et phénylhydrazine paraissent inhibiteurs.

En fin de compte, seule la phénazone intensifie la coloration à 60 minutes (la densité optique devient double de celle du témoin) mais elle n'accélère pas le développement de cette coloration).

Donc, si on veut améliorer la réaction en milieu phosphorique, parmi les substances essayées, le thiosemicarbazide par son action sur la cinétique, et la phénazone par son action intensifiante présentent de l'intérêt.

3) Réactions en milieux sulfosalicylique et paratoluènesulfonique

Tableau 25 : Intensité de la réaction colorée développée en milieu sulfosalicylique et paratoluènesulfonique en présence d' "intensifiants "

BMB en mn	Milieu sulfosalicylique		Milieu paratoluènesulfonique	
	10	30	10	30
Témoin	0,04	0,15	0,05	0,15
Acide phénylanthranilique	0,30	0,47	0,40	0,35
Tryptophane	0,20	0,26	0,20	0,21
Thiosemicarbazide	0,28	0,70	0,52	0,68
Phénazone	0,07	0,17	0,06	0,18
Diphénylamino-p-sulfonate	0,25	0,65	0,70	0,70
Phénylhydrazine	0,01	0,05	0,20	0,20
Glucuronolactone	0,05	0,15	0,04	0,16

La lecture du tableau ci-dessus montre :

- l'inactivité totale de la glucuronolactone et de la phénazone
- très faible activité du tryptophane
- comportement différent de la phénylhydrazine (inhibition en présence d'acide sulfosalicylique légèrement intensifiante en présence d'acide-p-toluènesulfonique
- accélération du développement de la coloration et intensification par l'acide phénylanthranilique, et surtout le thiosemicarbazide et le diphénylamino-p-sulfonate (la densité optique est plus de quatre fois supérieure à celle du témoin).

Dans l'ensemble des résultats obtenus apparaît une action intensifiante nette pour certaines substances. D'autres, comme la phénazone et la glucuronolactone ne donnaient pas les réactions attendues des publications en faisant mention. L'explication tient à la concentration trop faible que nous avons choisie dans l'intention de comparer justement entre elles ces substances dites intensifiantes.

Cette première investigation a donc été complétée par une étude plus détaillée.

Elle porte d'une part sur le thiosemicarbazide et le tryptophane qui nous semblaient particulièrement intéressants, d'autre part sur la phénazone et la glucuronolactone.

II - ETUDE PARTICULIERE DU THIOSEMICARBAZIDE

Les colorations obtenues avec le thiosemicarbazide sont roses en milieu arsénicosulfurique, phosphorique et sulfosalicylique (λ maximum = 515 nm) et violette en milieu paratoluènesulfonique (λ maximum = 530 nm). Notre étude détaillée a été effectuée en milieu arsénicosulfurique et phosphorique.

Dans le premier milieu nous avons vérifié que les concentrations du réactif arsénicosulfurique et de la diacétylmonoxime précédemment définies, ne sont pas modifiées par la présence de thiosemicarbazide. Nous avons ensuite étudié l'influence de la concentration de ce composé sur l'intensité des colorations : les colorations sont d'intensité croissante de 0,2 à 2 ml de thiosemicarbazide M/500. Mais au-dessus de 1 ml le milieu réactionnel est trouble. Les colorations des témoins réactifs augmentent parallèlement. 0,5 ml de thiosemicarbazide M/500 dans nos conditions opératoires représente la quantité qui nous donne une coloration intense et un milieu limpide avec un faible blanc réactif.

Les résultats présentés dans l'étude précédente avaient déjà mis en évidence qu'en milieu arsénicosulfurique, les colorations se développaient rapidement. Le graphique 24 traduit la cinétique de la réaction (urée 12 μ g) en précisant les intensités obtenues avec les temps courts de chauffage. Dès 8 minutes, les colorations ont atteint une intensité maxima.

En milieu phosphorique, les colorations augmentent avec la concentration en thiosemicarbazide sans limite supérieure. Dans ce milieu il n'apparaît pas de trouble pour les fortes concentrations en thiosemicarbazide.

Le tableau 25 montre les résultats obtenus en faisant varier la concentration en thiosemicarbazide.

Tableau 25 : Intensité de la réaction colorée développée en milieu phosphorique en fonction de la quantité de thiosemicarbazide

	Témoins réactifs					Urée 12 μ g								
TSC M/ 500	0	0,2	1			0,2	0,4	0,6	0,8	1				
TSC M/ 50	0			0,2	1						0,2	0,3	0,5	1
D.O. (à 520 nm)	0	0,02	0,05	0,08	0,24	0,14	0,20	0,23	0,27	0,29	0,43	0,48	0,50	0,55

En déduisant les valeurs des témoins réactifs on voit que l'intensification ne croît guère au delà de 0,6 ml.

On peut donc retenir comme concentration de thiosemicarbazide à introduire dans le mélange, celle apportée par 0,5 ml de solution M/ 500.

III - ETUDE PARTICULIERE DU TRYPTOPHANE

OREKHOVIC et TUSTANOVSKIJ (1949) ont été les premiers à utiliser le tryptophane. La réaction obtenue en présence de PO_4H_3 et de nitrite de sodium était rose. Il se forme, suivant ces auteurs, un complexe pourpre, le diacétyl tryptophane-urée où le tryptophane et l'urée se trouvent dans le rapport 1/4.

S'il y a excès de tryptophane par rapport à l'urée, ou excès d'urée par rapport au tryptophane, la coloration est jaune.

La réaction peut servir à un dosage d'uréide en repérant l'intensité maximum de la coloration qui correspond au rapport indiqué.

Nous reproduisons ci-joint un des tableaux présentés dans le travail des auteurs soviétiques.

Substances étudiées	Quantité en μg	Tryptophane en μg	Rapport molaire tryptophane : uréide	D.O.	Colorations de la solution
Citrulline	35	21	1 : 2	0,12	Rose-reflet violet
	35	13	1 : 3	0,15	Pourpre
	35	10	1 : 4	0,12	Pourpre-jaunâtre
	35	7	1 : 6	0,09	Jaune ou orangé pâle avec reflets violets
Urée	30	51	1 : 2	0,10	Rose-reflet violet
	30	25	1 : 4	0,13	Pourpre
	30	17	1 : 6	0,10	Pourpre-jaunâtre
	30	13	1 : 8	0,08	Jaune ou orangé pâle avec reflets violets

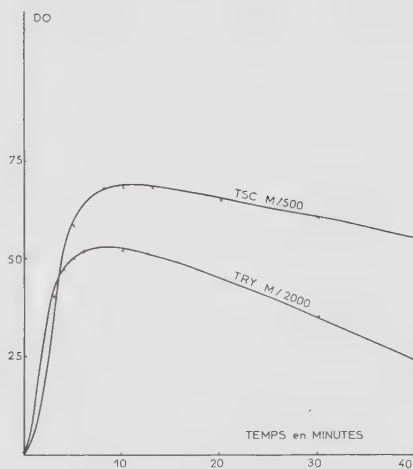
A leur suite PECHAR et coll. (1954) introduisirent le tryptophane dans la réaction colorée pour la stabiliser. Enfin MOMOSE et coll. (1965) ont signalé que cet acide aminé interfère de façon importante dans leur technique.

Nous avons cherché si les conditions d'acidité que nous avons adoptées étaient les meilleures en présence de tryptophane. Nous avons constaté, en milieu arsénicosulfurique que si on augmentait l'acidité en prenant 3,5 ml au lieu de 2 ml d'acide, la coloration avait une intensité encore trois fois plus élevée.

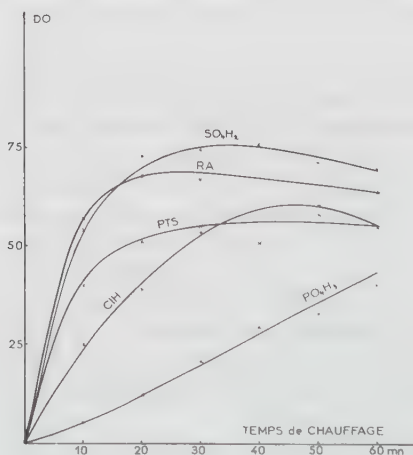
D'autre part, pour 6 μg d'urée, la quantité optima de tryptophane est 0,5 ml de solution M/2000, comme le montre le tableau ci-joint.

Tableau 27 : Intensité des colorations en milieu arsénicosulfurique (3,5 ml) en présence de quantités croissantes de tryptophane

	Témoin réactif			Urée 6 μg						
TRY M/2000 ml	0	0,2	0,5	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
D.O. à 500 nm	0,02	0,04	0,07	0,03	0,24	0,38	0,44	0,47	0,48	0,48



Graphique 24. Réaction urée-diacétylmonoxime
Cinétique en présence de thiosemicarbazide et de tryptophane
(en milieu arsénicosulfurique)



Graphique 25. Réaction urée-diacétylmonoxime
Cinétique en présence de phénazone

Dans ces conditions, l'accélération du développement de la réaction colorée est telle qu'après 6 minutes de bain-marie bouillant, l'intensité obtenue est maximum (graphique 24). Le tryptophane (TRY) est donc capable de donner une réaction colorée très intense, et entièrement développée après un temps de chauffage très court. Cependant, il n'est très actif qu'en milieu arsénicosulfurique concentré.

Cette interférence de tryptophane est importante à connaître car ce composé est un constituant normalement répandu dans les milieux biologiques. Or, dans le tableau ci-dessus nous remarquons que 0,1 ml de solution M/2000 (c'est-à-dire environ 10 µg) est une quantité déjà remarquablement active : des quantités de l'ordre de celles trouvées dans les milieux biologiques peuvent donc interférer dans une réaction colorée urée-diacétylmonoxime développée dans ces conditions. La quantité habituellement retenue de réactif arsénicosulfurique (2 ml pour 6 ml de volume total), crée un milieu acide beaucoup moins sensible à l'action du tryptophane. Il en est de même de PO_4H_3 .

L'utilisation du tryptophane pour intensifier la réaction colorée en vue d'application quantitative n'est pas possible car la concentration optima de tryptophane à introduire dans le milieu réactionnel est fonction de la quantité d'urée dans la prise d'essai.

IV - ETUDE PARTICULIERE DE LA PHENAZONE (ANTIPYRINE)

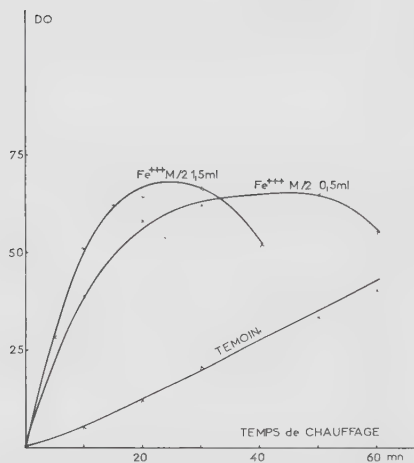
CERIOTTI et SPANDRIO (1963) qui ont préconisé l'emploi de phénazone l'introduisaient dans le milieu sulfurique en forte quantité : 16 mg dans 10 ml de mélange réactionnel.

Une coloration jaune citron est obtenue en présence de phénazone dans tous les milieux acides utilisés, présentent un maximum d'absorption à 460 nm. Nous avons vérifié que l'introduction de phénazone ne modifiait pas les quantités d'acide et de diacétylmonoxime (1 ml à 1 %) définies aux chapitres premier et deuxième.

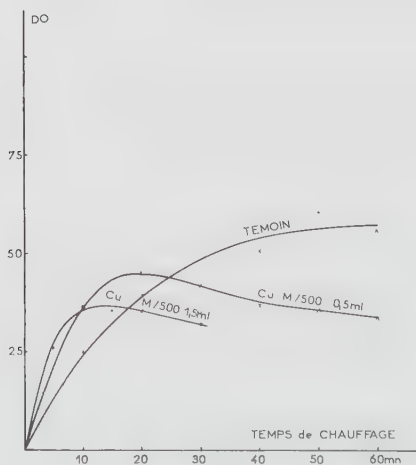
Pour nous rapprocher des conditions des auteurs, nous avons préparé une solution M/10 de phénazone (18,8 g %), et nous avons étudié l'influence de la concentration en phénazone sur l'intensité des colorations puisque dans nos essais antérieurs (page 89) nous avons eu des résultats peu significatifs en utilisant une trop faible quantité de cette substance.

Tableau 28 : Intensité des colorations en divers milieux acides en présence de quantités croissantes de phénazone

		Réactif arsénicosulfurique				Acide phosphorique				Acide sulfosalicylique			
PE M/10	ml	0	0,1	0,5	1	0	0,1	0,5	1	0	0,1	0,5	1
D.O. (460 nm)		0,03	0,53	0,73	0,71	0,03	0,21	0,24	0,25	0,03	0,29	0,54	0,52



Graphique 26. Réaction urée-diacétylmonoxime
Cinétique en milieu phosphorique en présence de phénazone et de sel ferrique



Graphique 27. Réaction urée-diacétylmonoxime
Cinétique en milieu phosphorique en présence de phénazone et de sel cuivrique

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus ont été obtenus dans les conditions habituelles avec 6 μ g d'urée et 30 minutes de bain-marie bouillant.

L'activité de la phénazone est remarquable dans les trois milieux acides étudiés : la coloration presque imperceptible des témoins atteint une intensité maxima en présence de 0,5 ml de solution M/10 de phénazone (9,9 mg). Une quantité supérieure n'apporte plus d'amélioration. En milieu arsénicosulfurique l'intensification est considérable.

Nous avons noté dans l'étude comparative précédente que, contrairement aux autres composés essayés dans ce chapitre, la phénazone ne semblait pratiquement pas accélérer le développement de la coloration, à la dose utilisée, d'ailleurs CERIOTTI et SPANDRIO dans leur première publication (1963) préconisaient un temps de chauffage de 50 minutes.

C'est pourquoi, avec la concentration précédemment définie, nous avons fait une étude détaillée des cinétiques en divers milieux acides (graphique 25).

Ce graphique met en évidence effectivement par rapport aux composés intensifiants précédents, une moindre activité de la phénazone sur la cinétique de la réaction urée-diacétylmonoxime dans les cinq milieux acides utilisés. Cependant, par comparaison aux graphiques 3, 4 et 5 nous remarquons que les colorations se développent un peu plus rapidement qu'en l'absence de substances intensifiantes. Un fait important à remarquer : en comparant les courbes de cinétique en milieu sulfurique (comme CERIOTTI et SPANDRIO) et arsénicosulfurique nous voyons qu'avec ce dernier réactif, les colorations ont déjà une intensité maxima après 20 minutes de chauffage, alors qu'en milieu sulfurique, il faut 40 minutes. L'acide arsénique, conserve donc, en présence de phénazone, ses propriétés particulières sur la cinétique des réactions colorées (voir chapitre premier).

Un an après leur première publication, les deux auteurs italiens ont proposé des sels métalliques pour accélérer la réaction urée-diacétylmonoxime en présence de phénazone : en milieu sulfurique, le fer leur permet d'obtenir un développement complet des réactions en 30 minutes.

Nous avons montré dans l'étude des sels métalliques que le Fe^{+++} en milieu phosphorique et le cuivre en milieu chlorhydrique étaient les métaux les plus actifs sur la cinétique des réactions. Nous les avons donc utilisés. Les graphiques 26 et 27 présentent les résultats obtenus avec les concentrations de sels métalliques précédemment définies comme les plus intéressantes (0,5 ml de Fe^{+++} M/2 et de cuivre M/500), en présence de la quantité optima de phénazone.

Par comparaison aux graphiques 16 et 17, on constate qu'en présence de phénazone, ces métaux sont moins actifs sur la cinétique que lorsqu'ils sont

seuls. Si on triple les quantités de sels métalliques, on compense en grande partie cette différence d'activité (graphique 26). Mais l'effet sur la cinétique est faible en présence de cuivre (graphique 27) et se fait au dépend de l'intensité de la coloration.

V - ETUDE PARTICULIERE DE LA GLUCURONOLACTONE

La glucuronolactone est un des derniers composés proposés (MOMOSE et coll. 1965). D'après ces auteurs la réaction obtenue en milieu phosphorique est intense et photostable. Nous avons donc pensé au départ, que la glucuronolactone était aussi une substance "intensifiante". Testée en solution M/500 dans l'étude comparative précédente, nous n'avions pas obtenu de résultat. Essayée en solution plus concentrée (M/10) se rapprochant ainsi de la quantité introduite par MOMOSE et coll. (10 mg) nous n'avons pratiquement pas obtenu de coloration plus intense que celle des témoins. Notons que les "blancs" réactifs sont légèrement colorés.

Nous n'avons observé qu'un seul effet de ce composé : il stabilise le développement de la réaction colorée en milieu phosphorique dès 40 minutes de chauffage, ce qui confirme les résultats de MOMOSE et coll.

CONCLUSION

De l'étude générale des substances intensifiantes, il ressort que l'acide phénylanthranilique, le diphenylamino-p-sulfonate, la phénylhydrazine, le thiosemicarbazide, le tryptophane et la phénazone modifient profondément les caractères habituels de la réaction colorée urée-diacétylmonoxime (spectre, cinétique). Il faut remarquer que les cinq premiers composés, qui possèdent tous un groupement aminé sont actifs à très faible dose, assez voisine de celle de l'urée, composé à doser. Ils modifient tous très nettement la cinétique de la réaction colorée, comme les oxydants ou les sels métalliques. La phénazone ou antipyrrique qui, contrairement aux précédents ne possède pas de groupe aminé, mais une fonction cétonique, est active à forte concentration voisine de celle de la diacétylmonoxime. Nous pouvons comparer son effet à celui de l'acétone, autre composé cétonique trouvé précédemment actif mais qui ne modifiait pas le spectre.

Les effets de tous ces composés varient suivant la nature du milieu acide. C'est en milieu arsénicosulfurique que ces composés sont les plus actifs. En milieu phosphorique leur effet est plus faible : le développement des colorations est accéléré par le thiosemicarbazide et le diphenylamino-p-sulfonate, le tryptophane et la phénylhydrazine se comportent comme des inhibiteurs, la phénazone donne une coloration très intense. Les oxydants et les sels métalliques restent actifs sur les réactions colorées développées en présence de substances intensifiantes.

Trois composés ont particulièrement retenu notre attention : le thiosemicarbazide d'abord, parce qu'il est capable d'améliorer très nettement la cinétique des réactions colorées dans un milieu phosphorique. Mais ce composé est encore plus actif en milieu arsénicosulfurique : dès 8 minutes de chauffage, nous avons obtenu dans les conditions les meilleures (0,5 ml de thiosemicarbazide M/500) une coloration rose entièrement développée et intense : pour 15 μ g d'urée la densité optique est 0,68.

Avec le tryptophane nous avons montré qu'en 6 minutes de bain-marie bouillant il était possible d'obtenir une réaction colorée orangée entièrement développée et très intense : pour 6 μ g d'urée, la densité optique est 0,41.

La phénazone enfin est le composé le plus actif que nous avons étudié. Par l'utilisation simultanée du réactif arsénicosulfurique (2 ml) la phénazone (0,5 ml de solution M/10) permet le développement en moins de 20 minutes, d'une coloration jaune citron la plus intense que nous ayons pu obtenir : pour 6 μ g d'urée, la densité optique est 0,70.

Suite à ces résultats nous avons retenu en vue d'application biologique l'utilisation de la phénazone ou du thiosemicarbazide.

CHAPITRE QUATRIEME

ETUDE DE LA REACTION COLOREE UREE-DIACETYLE

Bien que FEARON (1939) ait mis en évidence la stabilité plus grande de la monoxime, on a continué à utiliser le diacétyle.

En effet, NATELSON, SCOTT et BEFFA (1951) furent les premier à conseiller l'usage de la dicétone pour ne plus avoir d'hydroxylamine à détruire par addition d'oxydants.

Son état liquide l'a fait préférer par DICKENMANN et coll. (1954) CARAWAY et FANGER (1955).

Il ne faut pas cependant oublier son instabilité (CARAWAY et FANGER 1956), et le manque de fidélité des résultats (LECLERC et SCHWARTZ (1957). Le diacétyle est sensible à l'air et à la lumière, il se décompose même en ampoules scellées conservées à 0° à l'obscurité (PIEN et coll. 1936-1937). Il contient des impuretés, en particulier le méthylglyoxal, la méthyléthylcétone (qui s'élimine par distillation dans la fraction de tête), l'alcool amylique (qui se trouve dans la fraction de queue) (PIEN et coll. 1936-1937, WOLF 1960) - et l'éthanol (WOLF 1960).

Il y a une précaution essentielle à prendre vis à vis du diacétyle et qui a bien souvent échappé aux expérimentateurs et pendant longtemps à nous-mêmes. Il ne faut utiliser le diacétyle que fraîchement distillé. Un produit impur non distillé peut donner des colorations dix fois moins intenses !

Les essais qui suivent ont été exécutés avec un diacétyle distillé extemporanément en séparant le premier et le dernier quart du distillat.

I - INFLUENCE DES ACIDES SUR LA REACTION UREE-DIACETYLE

Nous avons défini les concentrations les plus favorables des acides phosphorique, sulfurique, chlorhydrique et du réactif arsénicosulfurique pour le développement de la réaction colorée.

Dans le tableau 29 sont présentés les résultats obtenus pour 60 µg d'urée et 1 ml de diacétyle M/10 en présence de PO₄H₃ et du réactif arsénicosulfurique

Tableau 29 : Intensité des colorations en fonction de la quantité d'acide

ml de réactif acide	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
PO ₄ H ₃ (BMB 30 mn)	0,5	0,60	0,74	0,69	0,65	0,49	0,39
R.A. (BMB 10 mn) (BMB 30 mn)	0,37 0,51	0,60 0,66	0,80 0,74	0,77 0,64	0,77 0,57	0,69 0,41	0,59 0,27

La concentration la plus favorable des deux réactifs acides est donc 2 ml, même pour le réactif arsénicosulfurique. On remarque que les colorations s'intensifient entre 10 et 30 minutes de chauffage pour les quantités inférieures de réactif arsénicosulfurique, alors qu'elles régressent à partir de 2 ml, et d'autant plus que la quantité d'acide est plus élevée.

La cinétique de la réaction en présence de PO_4H_3 et de réactif arsénicosulfurique est représentée dans le graphique 28 qui montre que les colorations sont entièrement développées après 6 minutes de chauffage en milieu arsénicosulfurique et pratiquement après 60 minutes en milieu phosphorique.

Quant aux concentrations optima en acide sulfurique et chlorhydrique, nécessaires dans la réaction urée-diacétyl : elles sont respectivement de 0,4 ml et de 1 ml.

Les réactions colorées se développent donc beaucoup plus rapidement avec le diacétyl qu'avec la diacétylmonoxime et les quantités d'acides à utiliser sont inférieures.

II - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN DIACÉTYLE

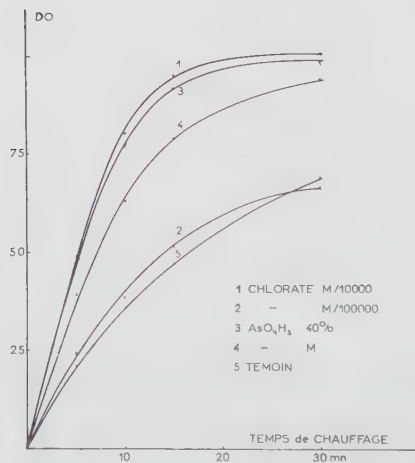
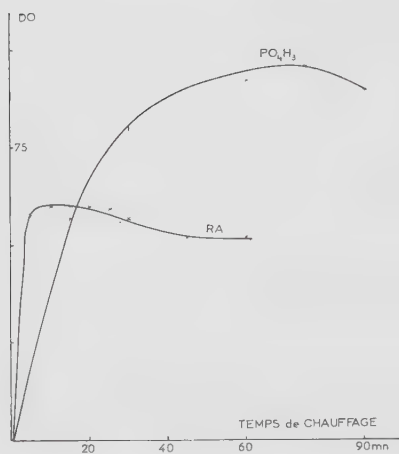
La réaction a été faite sur 60 μg d'urée en milieu phosphorique et arsénicosulfurique (2 ml) en présence de quantités variables de diacétyl M/10 (0,86 g pour 100 ml).

Tableau 30 : Intensité de la réaction colorée en fonction de la quantité de diacétyl

D distillé M/10 ml	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1	1,5	2
PO_4H_3 (BMB 60 mn)	0,29	0,65	0,85	1,08	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,20
R.A. (BMB 6 mn)	0,05	0,12	0,22	0,30	0,38	0,45	0,53	0,60	0,66	0,55

Les chiffres obtenus montrent qu'en milieu phosphorique 0,5 ml de diacétyl M/10 sont suffisants ; au contraire en milieu arsénicosulfurique, il faut 3 fois plus de diacétyl pour avoir la coloration la plus intense : 1,5 ml.

Ce dernier résultat est analogue à celui qui a été obtenu avec la diacétylmonoxime (page 47). Il n'en est pas de même avec PO_4H_3 : la quantité de diacétyl la plus favorable est nettement inférieure à celle trouvée pour la diacétylmonoxime (1,5 ml).



Pour avoir des résultats comparatifs avec la diacétylmonoxime, puis la diacétyldioxime, nous utiliserons 1 ml de diacétyl M/10 dans les essais suivants.

III - INFLUENCE DE L'ADDITION DE DIFFERENTS COMPOSES

Nous avons déjà dit que NATELSON et coll. (1951) avaient préconisé l'utilisation de diacétyl plutôt que de la diacétylmonoxime pour éviter l'introduction d'oxydants nécessaires avec la diacétylmonoxime pour détruire l'hydroxylamine formée au cours de l'hydrolyse de la monoxime en milieu fortement acide. Ces auteurs pensaient que l'hydroxylamine jouait un rôle puisque les oxydants étaient inactifs sur la réaction urée-diacétyl.

D'autre part, CERIOTTI et SPANDRIO (1963) ont introduit dans leur milieu réactionnel, la phénazone, l'acide maléique, etc ... pour détruire spécifiquement l'hydroxylamine.

Par l'étude de l'influence des oxydants, des sels métalliques, des solvants et des substances intensifiantes sur la réaction urée-diacétyl, nous avons voulu vérifier ces hypothèses.

1) Les oxydants

L'effet de ces composés est résumé par le graphique 29 : comme avec la diacétylmonoxime, ces composés modifient la cinétique des réactions. Le chlorate M/10 000 et AsO_4H_3 40 % ajoutés avant le chauffage sont les composés les plus actifs en milieu phosphorique.

Ces résultats sont donc contraires à ceux de NATELSON et coll. (1951). Cette discordance a peut-être pour origine l'utilisation par ces auteurs de diacétyl non distillé.

2) Les sels métalliques

Le Fe^{+++} , le cuivre sont actifs sur les réactions colorées développées en milieu phosphorique et chlorhydrique. Le Fe^{+++} en faible quantité (0,5 ml M/1000) est actif aussi en milieu sulfurique.

Les résultats sont identiques à ceux trouvés avec la diacétylmonoxime.

3) Les solvants

L'acétone ajoutée aux milieux phosphorique concentré (3,5 ml) et arsénosulfurique double l'intensité de la coloration urée-diacétyl.

4) Les substances intensifiantes

Le thiosemicarbazide (0,5 ml M/500), le tryptophane (0,5 ml M/2000) et la phénazone (0,5 ml M/10) modifient la coloration urée-diacétyl jaune qui passe respectivement au rose, à l'orangé et au jaune citron. Les colorations sont très intenses et très rapidement développées. Par exemple, nous avons obtenu pour 6 μ g d'urée et après 5 minutes de bain-marie bouillant, une densité optique de 0,53, 0,51 et 0,31 en présence respectivement de phénazone, de tryptophane et de thiosemicarbazide, alors que la réaction témoin n'était pas colorée.

L'hypothèse de CERIOTTI et SPANDRIO ne semble donc pas fondée : la phénazone intervient directement sur le complexe coloré urée-diacétyl, et non parce que détruisant l'hydroxylamine.

IV - UTILISATION D'UNE TEMPERATURE DE 37° POUR DEVELOPPER LA REACTION UREE-DIACETYLE

Nous avons étudié le développement à 37° des réactions colorées en milieu chlorhydrique, phosphorique et arsénicosulfurique. Précisons que ces essais ont été effectués à l'obscurité. Les concentrations les plus favorables sont :

- 2,5 à 3 ml de PO_4H_3
- 1,5 à 1,8 ml d'HCl
- 2 ml de réactif arsénicosulfurique

Ces concentrations sont donc supérieures à celles trouvées pour la réaction habituelle à 100°. En présence de HCl et de PO_4H_3 , les colorations se développent lentement.

L'influence de la quantité de diacétyl sur la réaction de 60 μ g d'urée est notée dans le tableau suivant où la diacétylmonoxime figure à titre comparatif.

Tableau 31 : Intensité des réactions colorées développées à 37° en fonction de la quantité de diacétyl

	Milieu arsénicosulfurique								Milieu phosphorique							
D M/10	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1		0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1		
DM M/10								1								1
Lecture après 60 mn	0,18	0,27	0,39	0,46	0,57	0,65	0,68	0,37	0,22	0,25	0,33	0,41	0,44	0,55	0,12	
Lecture après 120 mn	0,31	0,45	0,59	0,66	0,75	0,81	0,75	0,60	0,45	0,42	0,54	0,63	0,53	0,53	0,30	
Lecture après 180 mn	0,45	0,61	0,73	0,79	0,84	0,90	0,77	0,71	0,56	0,57	0,66	0,74	0,67	0,48	0,40	

Plus la concentration en diacétyl est élevée, plus les réactions se développent rapidement.

La comparaison avec la diacétylmonoxime met en évidence que la réaction avec le diacétyl est plus intense parce que plus rapide. Il est donc possible de développer rapidement des réactions colorées à 37°, avec le diacétyl.

Mais la coloration continue toujours à se développer, même pendant 3 heures et la reproductibilité est très mauvaise.

CONCLUSION

Les conditions expérimentales les meilleures sont :

- concentration optima en acide
 SO_4H_2 : 0,3 - 0,5 ml
 HCl : 1 ml
 PO_4H_3 : 2 ml
 réactif arsénicosulfurique : 2 ml
- concentration optima en diacétyl
 en milieu phosphorique : 0,5 à 1,5 ml
 en milieu arsénicosulfurique : 1,5 ml
- temps minimum de développement de la réaction
 la réaction est totale à 100° après 6 minutes en milieu arsénico-
 sulfurique, après 60 minutes en milieu phosphorique
- les oxydants, les sels métalliques, les solvants et les substances in-
 tensifiantes sont actifs.

Cette réaction colorée est donc proche de celle obtenue avec la diacétylmonoxime.

Les différences essentielles portent sur les quantités d'acide et de réactif, qui sont plus faibles, et sur le développement de la coloration qui est plus rapide. Les oxydants et la phénazone sont aussi actifs avec le diacétyl qu'avec la diacétylmonoxime et n'interviennent donc pas parce que détruisant l'hydroxylamine libérée par hydrolyse de la monoxime.

L'instabilité du diacétyl et la nécessité d'une distillation préalable nous font rejeter l'usage de la dicétone en vue d'applications analytiques.

CHAPITRE CINQUIEME

ETUDE DE LA REACTION COLOREE UREE-DIACETYLDIOXIME

Quoiqu'étudiée dès la mise au point des réactions colorées urée-alpha-dicétones (SMITH 1935, FEARON 1939, ARCHIBALD 1944, OREKHOVIC et TUSTANOVSKIJ 1949) la diacétyldioxime ou diméthylglyoxime fut utilisée pour la première fois par JANCIC (1952) pour doser l'urée. Elle était dissoute dans HCl concentré. Elle fut préconisée ensuite pour révéler des produits d'oxydation des bases puriques et pyrimidiques (KIDO 1957). Enfin, plus récemment, KULHANEK et coll. (1963-1964) ont proposé une solution de diacétyldioxime dans l'éthanol pour le dosage de la citrulline et de l'ornithine carbamyl-transférase, et DUDEK (1966) pour le dosage de l'urée.

L'insolubilité presque totale de la diacétyldioxime dans l'eau nécessite sa dissolution dans un acide ou dans un solvant organique.

I - ESSAIS EFFECTUES AVEC DES SOLUTIONS DE DIACETYLDIOXIME DANS LES ACIDES

Nous avons préparé des solutions de diacétyldioxime dans l'acide phosphorique et dans le réactif arsénicosulfurique. Ces solutions sont très peu stables, ce qui leur enlève tout intérêt. Nous avons cependant effectué des essais avec de tels réactifs parce qu'ils permettent d'éviter l'interférence des solvants habituellement utilisés pour dissoudre la diacétyldioxime et donc de préciser leur effet exact.

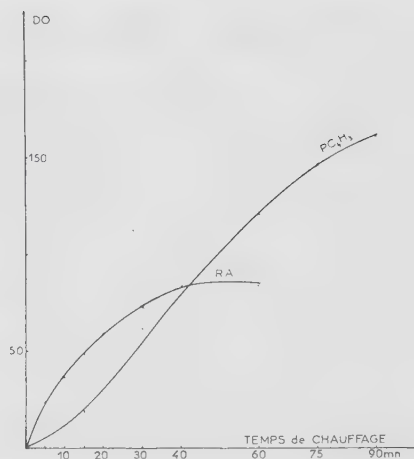
1) Concentration optima en acide

Le tableau 32 présente les résultats obtenus en milieu phosphorique pour 60 μg d'urée et 1 ml de solution phosphorique de diacétyldioxime M/10.

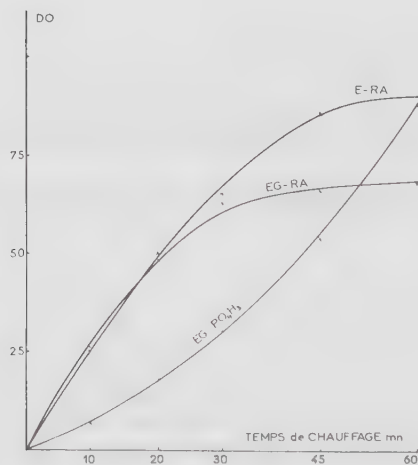
Tableau 32 : Intensité de la réaction urée-diacétyldioxime en fonction de l'acidité

PO ₄ H ₃ ml (quantité totale)	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
BMB - 20 mn	0,04	0,08	0,18	0,29	0,32	0,31	0,24
BMB - 40 mn	0,07	0,24	0,50	0,68	0,77	0,75	0,63

La quantité optima de PO₄H₃ est donc 3 ml (dans les quantités de PO₄H₃ présentées dans le tableau est compris 1 ml apporté par la solution de diacétyldioxime). Par un essai similaire nous avons défini la quantité optima de réactif arsénicosulfurique : elle est de 2 ml.



Graphique 30. Réaction urée-diacétyldioxime
Cinétique en milieu phosphorique et arsénicosulfurique



Graphique 31. Réaction urée-diacétyldioxime
Cinétique en présence d'éthylèneglycol (EG) et d'éthanol (E)

Par comparaison à la diacétylmonoxime et au diacétyl, la diacétyldioxime exige une plus grande quantité de PO_4H_3 pour donner le maximum de coloration.

2) Concentration optima en diacétyldioxime

Les colorations les plus intenses sont obtenues pour 1,8 ml de diacétyldioxime M/10 ; mais les variations de l'intensité sont très peu importantes au dessus de 1 ml (densité optique 0,65 pour 1 ml et 0,68 pour 1,8 ml).

Ces résultats sont donc similaires à ceux obtenus avec la diacétylmonoxime. Nous adoptons donc une concentration équivalente à 1 ml de diacétyldioxime M/10. Pour ce faire, sachant que la quantité optima de PO_4H_3 est 3 ml et celle du réactif arsénicosulfurique 2 ml, nous avons préparé une solution phosphorique de diacétyldioxime M/30 et arsénicosulfurique M/20. L'introduction respective de 3 et 2 ml de ces deux réactifs apportera simultanément 1 ml de diacétyldioxime M/10 dans le mélange réactionnel.

3) Cinétique des réactions urée-diacétyldioxime

Dans les conditions ainsi définies, nous avons effectué une étude des cinétiques de réactions. Le graphique 30 met en évidence qu'en milieu arsénicosulfurique les colorations sont entièrement développées après 40 minutes de chauffage, alors qu'en milieu phosphorique, elles ne le sont pas encore après 90 minutes.

La cinétique de la réaction urée-diacétyldioxime est donc nettement plus lente que la réaction avec le diacétyl et avec la diacétylmonoxime.

4) Etude des composés interférant dans la réaction

Les oxydants, les sels métalliques, les solvants et les substances interférentes sont aussi actifs avec la diacétyldioxime qu'avec la diacétylmonoxime et le diacétyl.

a) Influence des oxydants

Nous avons étudié les mêmes composés qu'avec la diacétylmonoxime et les résultats sont strictement superposables.

b) Influence des métaux

La diacétyldioxime étant un réactif de certains cations métalliques, il était intéressant de vérifier la réactivité de ces composés sur les colorations urée-diacétyldioxime. Nous avons remarqué que l'addition de la dioxime dans le mélange réactionnel contenant des sels métalliques colorés, augmentait la coloration due à ces cations. Les blancs réactifs sont donc plus colorés que normalement.

Voici les résultats obtenus en milieux phosphorique et arsénicosulfurique.

Tableau 33 : Intensité de la réaction urée-diacétyldioxime en présence de sels métalliques (0,5 ml de solution M/10)

	Témoin sans métal	Cuivre	Fer ferrique	Nickel	Cobalt	Manganèse
Milieu phosphorique						
- BM 10 mn	0,07	0,17	0,25	0,09	0,12	0,12
- BM 30 mn	0,50	0,68	0,78	0,49	0,56	0,65
Milieu arséni- cosulfurique						
- BM 10 mn	0,41	0,46	0,10	0,44	0,45	0,42
- BM 30 mn	0,71	0,88	0,17	0,84	0,72	0,64

En milieu phosphorique, le nickel n'interfère pas. Nous avons retrouvé les métaux déjà actifs précédemment : fer et cuivre et plus faiblement manganèse. Mais cette activité semble moins importante que celle observée avec la diacétylmonoxime (pages 72 et 73).

Le tableau 33 présente également les résultats obtenus en milieu arsénicosulfurique : le cuivre et le nickel sont légèrement actifs, et donnent des réactions colorées un peu plus intenses que celles du témoin. Le fer, au contraire, est très actif à cette concentration : il bloque le développement de la réaction colorée.

Dans ces deux milieux acides, nous avons également étudié l'influence de solutions plus diluées de sels métalliques (M/1000) : le fer en milieu phosphorique et le cuivre, en milieu arsénicosulfurique permettent le développement de colorations légèrement plus intenses.

d) Influence des solvants

Cette étude est importante puisque nous sommes obligés d'utiliser un solvant pour préparer une solution stable de diacétyldioxime.

Nous avons précisé leur action en milieu phosphorique et arsénicosulfurique. L'éthanol et le méthanol inhibent partiellement la réaction ainsi que l'éthylèneglycol, mais à un degré moindre.

Le tableau 34 présente les résultats obtenus pour 60 μ g d'urée en présence d'éthanol en milieux phosphorique et arsénicosulfurique. La diacétylmonoxime sert de témoin de comparaison (solution d'oxime M/10 ou équivalent, 1 ml - Temps de chauffage 20 minutes).

Tableau 34 : Intensité des réactions colorées en présence d'éthanol

	PO ₄ H ₃ - 3 ml					Réactif arsénicosulfurique - 2ml				
DM M/10 ml	1	1				1	1			
DD M/10 dans éthanol ml			1					1		
DD dans les acides ml				3	3				2	2
Ethanol ml		1			1		1			1
D.O.	0,82	0,37	0,08	0,31	0,09	0,74	0,70	0,53	0,71	0,50

On remarque que l'effet de l'éthanol est plus marqué d'une part sur les réactions développées en milieu phosphorique qu'en milieu arsénicosulfurique, d'autre part sur les réactions obtenues avec la diacétyldioxime : l'inhibition due à l'éthanol atteint en milieu arsénicosulfurique 5 % avec la diacétylmonoxime et 30 % avec la diacétyldioxime ; en milieu phosphorique elle est de même respectivement de 55 % et 71 %.

L'acétone est particulièrement active sur la réaction colorée urée-diacétyldioxime : 0,5 ml de ce solvant fait passer la densité optique de la réaction donnée par 30 μ g d'urée après 20 minutes de bain-marie bouillant de 0,10 à 0,90 en milieu phosphorique. et de 0,21 à 0,54 en milieu arsénicosulfurique, alors que les blancs réactifs (réaction acétone-diacétyldioxime) sont respectivement de 0,08 et 0,13. L'acétone est donc plus active avec la diacétyldioxime qu'avec la diacétylmonoxime ; la réaction parasite (acétone-diacétyldioxime) est un peu plus importante aussi.

II - ESSAIS EFFECTUES AVEC DES SOLUTIONS DE DIACETYLDIOXIME DANS DES SOLVANTS ORGANIQUES

Nous avons effectué ces essais :

- 1) avec une solution de diacétyldioxime dans l'éthanol parce que déjà préconisé par KULHANEK et coll. (1963)
- 2) avec une solution de diacétyldioxime dans l'éthylèneglycol puisque ce solvant ne modifiait que peu l'intensité des colorations et on évite ainsi les inconvénients dus à l'évaporation de l'éthanol (SIEST D. et coll. 1961)
- 3) avec une solution acétonique de diacétyldioxime, car nous avons pensé utiliser simultanément l'effet intensifiant de ce solvant.

1) Solution dans l'éthanol ou l'éthylèneglycol

La préparation d'une solution M/10 de diacétyldioxime est facile avec l'éthanol, plus difficile avec l'éthylèneglycol.

Ces deux solvants ne modifient pas les caractères de la réaction urée-diacétyldioxime définis précédemment : les concentrations en acide et en diacétyldioxime trouvées restent valables. Seul l'éthylèneglycol a une légère action sur la cinétique (graphique 31) : la réaction colorée est entièrement développée en 30 minutes en présence de ce solvant alors qu'il faut 40 à 45 minutes avec l'éthanol ou en absence de solvant (graphique 30).

Avec ces solutions organiques de diacétyldioxime nous avons obtenu les mêmes résultats avec les différents adjuvants employés dans la réaction. Nous avons vérifié que la diacétyldioxime est capable de donner une coloration avec l'urée en milieu acide à 37°. C'est ce que met en évidence le tableau ci-dessous dans lequel nous avons introduit des points de comparaison avec la diacétylmonoxime.

Tableau 35 : Intensités des réactions colorées obtenues à 37° avec la diacétyldioxime et la diacétylmonoxime en présence d'éthanol

	Milieu phosphorique			Milieu arsénicosulfurique		
DM M/10 ml	1	1		1	1	
DD dans éthanol ml			1			1
Ethanol ml		1			1	
BM 37°						
- pendant 3 h.	0,40	0,16	0	0,69	0,47	0,19
- pendant 7 h.	0,48	0,24	0,005	0,78	0,66	0,33
- pendant 23 h.	0,64	0,36	0,03	0,73	0,72	0,44
- pendant 31 h.	0,67	0,41	0,04	0,68	0,71	0,45

Nous remarquons que la diacétyldioxime ne permet qu'un développement lent des colorations nettement moins intenses que celles qui sont obtenues avec la diacétylmonoxime. Les réactions colorées sont même presque nulles en milieu phosphorique. La présence d'éthanol n'est pas totalement responsable de cette faible activité : une hydrolyse plus lente de la dioxime peut être à l'origine de la faible réactivité, inférieure à celle de la diacétylmonoxime et encore plus à celle du diacétyle.

2) Solution acétonique de diacétyldioxime

L'action intensifiante de l'acétone et ses caractères habituels de bon solvant nous ont incité à essayer un réactif acétonique. La solubilité de la diacétyldioxime dans ce solvant permet la préparation d'une solution M/5. 0,5 ml d'une telle solution apporte simultanément la quantité optima de diacétyldioxime et d'acétone.

Nous avons étudié la cinétique de la réaction.

Tableau 36 : Intensité des réactions colorées en présence de quantités variables de réactif acétonique et de PO_4H_3 , et en fonction du temps de chauffage

BMB en mn	10	20	40	60
Acide phosphorique 2 ml, réactif diacétyldioxime acétonique 0,4 ml	0,11	0,33	0,60	0,57
Acide phosphorique 2 ml, réactif diacétyldioxime acétonique 0,6 ml	0,12	0,34	0,43	0,51
Acide phosphorique 3 ml réactif diacétyldioxime acétonique 0,5 ml	0,37	0,73	0,65	0,62

Les témoins acétone-diacétyldioxime ont été effectués dans tous les cas, et déduction a été faite dans les D.O. présentées.

On remarque que l'acétone agit comme tous les "intensifiants" en accélérant la réaction colorée au départ puis en la stabilisant ensuite. La réaction

est entièrement développée après 20 minutes dans le troisième essai du tableau.

Mais le développement simultané de la coloration parasite diacétyldioxi-me-acétone quoique faible (densité optique = 0,08 après 20 minutes de chauffage) diminue l'intérêt d'un réactif acétonique.

CONCLUSION

Dans l'étude des conditions opératoires, nous avons montré que pour le volume final habituel de 6 ml : la concentration optima en acide est :

PO_4H_3 3 ml
Réactif arsénicosulfurique 2 ml

La concentration optima en diacétyldioxime est :

1 à 2 ml de diacétyldioxime M/10

La cinétique de la réaction est lente : il faut 40 minutes de bain-marie bouillant pour avoir une réaction entièrement développée en milieu arsénicosulfurique.

Les oxydants, les sels métalliques, les solvants et les substances intensifiantes sont actifs avec la dioxime.

Enfin la diacétyldioxime ne donne que très lentement une réaction colorée à la température de 37°.

Les différences essentielles observées avec la diacétyldioxime, par comparaison avec la diacétyldioxime et au diacétyl portent sur la plus grande acidité nécessaire dans le milieu et une cinétique de réaction plus lente.

Ces différences ne sont donc pas à l'avantage de la dioxime. En outre son insolubilité dans l'eau est un inconvénient car les solvants utilisés pour la dissoudre interfèrent dans la réaction colorée. La dissolution de la dioxime dans les acides est à rejeter car ces solutions sont très instables. Douze heures après la préparation de tels réactifs, nous avons déjà noté une baisse très nette de leur réactivité : les colorations obtenues avec un réactif arsénicosulfurique et phosphorique étaient respectivement cinq et deux fois plus faibles que celles obtenues avec un réactif fraîchement préparé.

C'est pourquoi, nous n'avons pas cru nécessaire de retenir ce réactif pour des applications analytiques dans les milieux biologiques.

CHAPITRE SIXIEME

ETUDE DES REACTIONS COLOREES

AVEC LA PHENYLPROPANEDIONE ET SES OXIMES

L'historique des réactions colorées des composés carbamidés avec les dicétones (que nous avons brièvement exposée dans l'introduction de la première partie de ce Travail) a mis en relief, l'apparition de la phénylpropanedione (PPD) en tant que produit de remplacement du diacétyl. Cette réaction colorée, entrevue par MULLER (1935) fut développée par ARCHIBALD (1945) qui, à l'exemple de FEARON (1939) préféra la monoxime cristallisée, à la dicétole liquide. Elle fut appliquée au dosage de l'urée dans les milieux biologiques : l'échantillon, convenablement préparé, est additionné d'un réactif acide composé de PO_4H_3 et SO_4H_2 et d'une solution alcoolique de phénylpropanedione-monoxime (PPDM). Un long temps de chauffage au bain-marie bouillant est nécessaire pour développer la coloration rouge (60 minutes). Pour ARCHIBALD les avantages de ce réactif par rapport à la diacétylmonoxime sont :

- une moindre volatilité
- une moindre sensibilité à la citrulline et à d'autres dérivés de l'urée
- une coloration rouge plus facile à étudier par colorimétrie que le jaune.

Cependant, la durée du chauffage et l'insolubilité de ces réactifs dans l'eau sont des inconvénients. La sensibilité de la coloration est également plus faible (KAWERAU 1946).

Le tableau synoptique (page 14) montre que la technique originale contrairement à celle qui est pratiquée avec la diacétylmonoxime a été très peu modifiée.

Assez souvent utilisée en biochimie générale pour l'étude des dérivés carbamidés du métabolisme intermédiaire, la technique d'ARCHIBALD a été peu préconisée en chimie clinique. Le long temps de chauffage, cause majeure de cet insuccès relatif, n'a pas permis l'utilisation de la PPDM dans l'analyse par appareil automatique (MARSH et coll. 1957). On a proposé pour y remédier, le chauffage à l'autoclave (MURAYAMA 1952).

DICKENMANN et coll. (1954), qui pour des raisons de commodité, préférèrent la dicétole liquide à la monoxime cristallisée, ne préconisaient qu'un chauffage de 15 minutes mais les colorations n'étaient que partiellement développées.

Au cours de notre étude, nous avons fait deux observations fortuites que nous rappelons.

En 1961, nous avons montré que l'adjonction de protéines dans le milieu réactionnel permettait d'accélérer la vitesse de développement de la réaction urée-PPDM. Un an plus tard, le travail de TIMMERMANS (1962) confirmait nos résultats : par l'utilisation d'édestine en milieu chlorhydrique, cet auteur obtenait également des colorations qui se développaient rapidement (15 minutes).

Au cours de nos essais effectués avec la PPD et ses oximes, la nécessité d'utiliser des solvants organiques pour dissoudre ces réactifs, nous a permis d'observer une réaction colorée nouvelle des protéines : en présence d'acétone, et en milieu acide, les protéines développent avec la phénylpropanedione-dioxime, et à un degré moindre avec la monoxime et la dicétone même, une coloration bleue.

Les résultats expérimentaux dont nous allons faire état ont été obtenus dans des conditions opératoires comparables à celles utilisées avec le diacétyle et ses oximes.

La préparation d'une solution de PPDD étant particulièrement difficile, vu la très faible solubilité de ce composé, même dans les solvants organiques, nous n'avons étudié que la PPD et la PPDM.

Voici les conditions opératoires utilisées :

- prise d'essai d'urée (en général 60 μ g)
- PO_4H_3 ou réactif arsénicosulfurique n ml
- solution alcoolique M/5 de PPD ou de PPDM 0,5 ml
- solution de substance à étudier 0,5 ml
- eau distillée q.s.p. 6 ml

Bain-marie bouillant 30 minutes ou 60 minutes

Refroidir 10 minutes (à l'obscurité)

Lecture de la coloration rose violet à 540 nm. Les spectres des réactions colorées données par la PPD et la PPDD sont strictement superposables et montrent en effet un maximum d'absorption à 540 nm (graphique 32).

I - REACTION UREE-PHENYLPROPANEDIONE

La phénylpropanedione se présente sous forme d'un liquide jaune, huileux, inodore. Sa conservation est limitée. A l'exception de DICKENMANN et coll. (1954) à notre connaissance elle n'a pas été préconisée pour le dosage des dérivés carbamidés. Ces auteurs utilisaient une solution de PPD dans l'acide phosphorique dilué.

1) Recherche de la concentration optima en dicetone

La réaction a été pratiquée sur 60 μ g d'urée, en présence de 3 ml de réactif arsénicosulfurique. Pour compenser les variations d'intensité dues à l'introduction d'éthanol avec la solution de PPD, nous avons ajouté un même volume d'éthanol dans tous ces essais (1 ml).

Tableau 37 : Intensité des réactions colorées en milieu arsénicosulfurique en fonction de la quantité de phénylpropamedione

PPD M/5 (dans éthanol) ml	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
BMB 30 mn	0,08	0,19	0,30	0,39	0,49	0,57	0,63	0,66	0,71	0,79

Ce tableau montre que l'intensité des colorations croît avec la quantité de réactif jusqu'à 1 ml de solution alcoolique M/5. Une quantité de PPD n'est plus soluble dans le milieu réactionnel acide défini plus loin. Nous avons vérifié ce fait avec la dicétone non diluée dont la limite de solubilité pour 6 ml de mélange réactionnel phosphorique final est 0,02 ml.

Nous n'avons donc pu définir une concentration optima avec ce réactif. Pour éviter sûrement la formation d'un trouble et limiter simultanément l'introduction de grandes quantités d'éthanol (inhibiteur), nous avons adopté pour ces essais 0,5 ml de solution M/5. Cette quantité est équivalente à celle utilisée avec la diacétylmonoxime. Mais le tableau a montré que les colorations étaient encore nettement intensifiées par l'introduction d'une quantité de PPD supérieure à 0,5 ml de solution M/5. Ce qui n'était plus le cas avec le diacétyle (voir tableau 30) où l'augmentation d'intensité est faible. Nous pouvons donc dire qu'une plus grande quantité de dicétone est nécessaire avec la PPD.

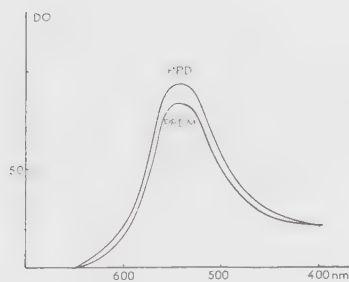
2) Concentration optima en acide

Ces essais n'ayant d'autre but qu'une comparaison avec les autres dicétones, nous avons étudié seulement PO_4H_3 , SO_4H_2 et le réactif arsénicosulfurique.

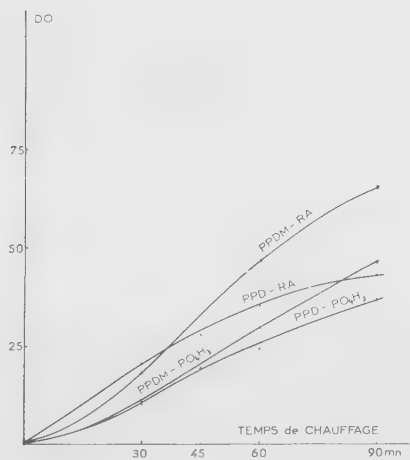
Les quantités les plus favorables pour l'intensité des réactions colorées urée-PPD apparaissent en examinant le tableau 38.

Tableau 38 : Intensité de la réaction urée-PPD en fonction de la quantité d'acide

ml d'acides	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5
SO_4H_2 - BMB 30 mn (R-P)	0,49	0,51	0,02	0	0	0			
PO_4H_3 - BMB 60 mn (R-P)		0,30	0,49	0,63	0,70	0,77	0,69	0,47	0,43
R.A. - BMB 30 mn		0,11	0,30	0,44	0,56	0,59	0,56	0,39	0,31
60 mn		0,52	0,19	1,07	1,2	0,22	1,15	0,97	0,71



Graphique 32. Spectres d'absorption de la réaction colorée urée-phénylpropanedione et urée-phénylpropanedionemonoxyde



Graphique 33. Cinétique des réactions colorées urée-phénylpropanedione et urée-phénylpropanedionemonoxyde en milieux phosphorique et arsénicosulfurique

La réaction la plus intense est donc obtenue avec 3 ml de PO_4H_3 et 0,5 à 1 ml de SO_4H_2 . Tout volume supérieur est fortement inhibiteur. L'addition d'acide arsénique à SO_4H_2 permet d'obtenir des colorations légèrement plus intenses mais surtout lève en partie l'inhibition observée avec SO_4H_2 seul. La quantité optima de réactif arsénicosulfurique est 3 ml (peu de variations entre 2,5 et 3,5 ml). Avec ce réactif une acidité plus grande est donc nécessaire pour la PPD par rapport au diacétyle.

3) Cinétique de la réaction urée-phénylpropanedione

Le graphique 33 met bien en évidence que le développement de la réaction est comme toujours plus rapide en milieu arsénicosulfurique que phosphorique. Mais, même avec le premier de ces milieux, les colorations n'ont pas atteint leur maximum à 90 minutes.

La cinétique de cette réaction est donc beaucoup plus lente que celle du diacétyle.

4) Influence des substances trouvées interférentes avec le diacétyle et ses oximes

Les oxydants, les sels métalliques, les substances intensifiantes sont actifs sur cette réaction urée-PPD.

a) Les oxydants

La chloramine ajoutées après le chauffage intensifie très nettement les colorations développées en milieu phosphorique : 0,5 ml d'une solution M/1000 provoquent une augmentation d'intensité de 100 %. Cette intensification a été obtenue même pour des réactions colorées développées après 60 minutes de bain-marie bouillant.

b) Les sels métalliques

Nous avons examiné l'interférence de Fe^{+++} , du cuivre et du manganèse en milieu phosphorique.

Tableau 39 : Intensités de la réaction urée-phénylpropanedione en présence de (0,5 ml de solution M/10) de sels métalliques

	Témoin	Fe^{+++}	Cuivre	Manganèse
BMB - 30 mn	0,28	0,77	0,60	0,76
- 60 mn	0,64	1,45	1,30	1,30

Les trois sels métalliques sont donc très actifs. Mais ils ne semblent pas modifier la cinétique de la réaction qui se développe encore de plus de 100 % entre 30 et 60 minutes.

c) Acétone

Ce solvant (à la dose de 0,5 ml) n'a pas modifié la réaction colorée.

d) Divers adjuvants

Nous avons testé le thiosemicarbazide, la phénazone et le tryptophane, en milieu phosphorique et arsénicosulfurique aux concentrations trouvées les plus favorables avec la diacétylmonoxime. La coloration habituelle de rose violet devient jaune orangé en présence de phénazone (0,5 ml M/10) bleu violet en présence de thiosemicarbazide (0,5 ml M/500) mais elle reste inchangée en présence de tryptophane (0,5 ml M/2000).

Dans le tableau suivant nous présentons les résultats obtenus pour 15 μ g d'urée. Les colorations ont été mesurées à 540 nm pour le témoin et avec le tryptophane, 480 nm avec la phénazone, et 560 nm avec le thiosemicarbazide.

Tableau 40 : Intensités de la réaction urée-phénylpropanedione en présence de divers adjuvants

	Témoin		Phénazone		Thiosemicarbazide		Tryptophane	
	PO ₄ H ₃	R.A.	PO ₄ H ₃	R.A.	PO ₄ H ₃	R.A.	PO ₄ H ₃	R.A.
BMB - 30 mn	0	0,09	0,12	0,57	0,47	0,55	0,02	0,11
- 60 mn	0,08	0,15	0,22	0,65	0,75	0,48	0,08	0,18

Le tryptophane est pratiquement inactif à cette concentration. Par contre la phénazone et le thiosemicarbazide permettent le développement de réactions colorées très intenses. De plus, ces deux composés, en particulier en milieu arsénicosulfurique, modifient très nettement la cinétique de la réaction urée-PPD qui est même entièrement développée après 30 minutes de bain-marie bouillant en milieu arsénicosulfurique avec le thiosemicarbazide. Le comportement de ces substances est donc comparable à celui observé avec le diacétyle.

Cette activité est particulièrement intéressante pour améliorer cette réaction colorée aussi bien du point de vue sensibilité que cinétique.

II - REACTION UREE-PHENYLPROPANEDIONEMONOXIME (PPDM)

La PPDM préconisée par ARCHIBALD (1945) est un produit blanc cristallisé insoluble dans l'eau.

La réaction avec l'urée a été étudiée en France par VELAY (1957).

1) Recherche de la concentration optima en PPDM

Comme avec la PPD, nous nous sommes heurtés à des problèmes de solubilité de ce réactif. Nous avons effectué une étude de l'intensité des colorations en faisant varier la quantité de solution de PPDM de 0,1 à 1 ml (voir protocole défini avec la PPD).

De 0,5 à 1 ml de solution M/5, le gain en intensité atteint encore 40 %. Les colorations obtenues sont plus faibles qu'avec la PPD : dans des conditions exactement superposables, 60 μ g d'urée donnent une densité optique de :

0,35 et 0,50 avec 0,5 et 1 ml de PPDM

0,49 et 0,79 avec 0,5 et 1 ml de PPD

Nous avons également essayé sans succès de préparer des solutions de PPDM dans les acides : la dissolution obtenue par chauffage est suivie d'une recristallisation après refroidissement, même avec des quantités correspondant à des solutions M/20.

Dans la réaction urée-PPDM un grand excès de réactif dicétonique est donc nécessaire et cet excès doit encore être plus important que celui déjà noté avec la diacétylmonoxime : pour 1 ml d'urée M/1000, il faut plus de 1 ml de PPDM M/5 donc un rapport moléculaire 1/200.

Dans les essais qui suivent, comme avec la PPD, nous utiliserons 0,5 ml de solution éthanolique M/5 de PPDM.

2) Influence des acides

Nous avons étudié les réactions colorées en milieu phosphorique, sulfurique et arsénicosulfurique.

Tableau 41 : Intensité des colorations en fonction de la quantité d'acide phosphorique, sulfurique et arsénicosulfurique

ml d'acides	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5
SO ₄ H ₂ - BMB 30 mn	0,52	0,60	0,24	0,10	0	0	0		
PO ₄ H ₃ - BMB 60 mn		0,14	0,26	0,35	0,45	0,51	0,55	0,46	0,37
R.A. - BMB 30 mn		0,24	0,34	0,40	0,43	0,44	0,42	0,35	0,28
R.A. - BMB 60 mn		0,92	1	1,07	1,07	1,07	0,97	0,92	0,60

Les quantités les plus favorables sont donc :

0,5 à 1 ml pour SO_4H_2

3,5 ml pour PO_4H_3

2 à 3 ml pour le réactif arsénicosulfurique

Par comparaison au tableau 38, nous remarquons qu'il faut une acidité légèrement plus grande en milieu phosphorique avec la PPDM (3,5 ml) qu'avec la PPD (3 ml). Les colorations sont également plus intenses avec la dicétone.

Nous retrouvons ici aussi des différences très nettes entre les effets de SO_4H_2 seul ou additionné d' AsO_4H_3 : alors qu'avec SO_4H_2 seul, la concentration en acide est très critique, tout excès étant rapidement inhibiteur, au contraire en présence d' AsO_4H_3 les variations de l'acidité ont une répercussion bien moindre sur l'intensité des colorations. C'est l'effet "tampon" déjà noté dans les réactions urée-diacétyle et ses oximes.

Dans les essais qui suivent nous utiliserons 3,5 ml PO_4H_3 ou 2 ml de réactif arsénicosulfurique.

3) Cinétique de la réaction

Le graphique 33 met en évidence que, comme avec la PPD, les colorations ont un développement très lent même en milieu arsénicosulfurique, c'est un inconvénient certain.

4) Influence des substances trouvées intensifiantes pour les précédentes dicétones

a) les oxydants

L'activité observée avec la chloramine est identique à celle trouvée pour la PPD.

b) les sels métalliques

Tableau 42 : Intensités de la réaction urée-PPDM développée en milieu phosphorique en présence de sels métalliques (0,5 ml de solution M/10)

	Témoin	Fe^{+++}	Cuivre	Manganèse
BMB - 30 mn	0,22	0,54	0,45	0,45
- 60 mn	0,58	0,60	1,05	1,10

L'activité de ces métaux est importante. Elle est cependant plus faible qu'en présence de PPD (voir tableau 39). Mais on remarque une action stabilisante du fer sur la cinétique : la réaction évolue peu entre 30 et 60 minutes de chauffage.

Notons qu'il y a une légère différence d'acidité entre les essais, avec la PPD (PO_4H_3 3 ml) et la PPDM (3,5 ml).

L'activité des sels métalliques en présence de ces dicétones est marquée par une plus grande intensification des colorations qu'avec la diacétylmonoxime, en particulier le manganèse. Nous confirmons ainsi l'observation de FOLLEY et GREENBAUM (1948) qui avaient remarqué l'interférence de ce métal.

c) les solvants

L'éthylèneglycol, l'éthanol, le dioxane et l'acétone sont utilisables pour préparer des solutions de PPDM. Les colorations obtenues avec des solutions de PPDM dans ces solvants sont d'intensité décroissante de l'éthylèneglycol à l'éthanol, au dioxane et à l'acétone. Le méthylal et la méthyléthylcétone sont totalement inhibiteurs et provoquent la formation de colorations jaunes brunes. Nous n'avons pas obtenu d'intensification par l'acétone.

d) certains adjuvants

Les conditions expérimentales sont semblables à celles utilisées par la PPD à l'exception de la concentration de PO_4H_3 qui est 3,5 ml au lieu de 3 ml avec la dicétone.

Tableau 43 : Intensités de la réaction urée-phénylpropanedionemonoxime en présence de divers adjuvants

	Témoin		Phénazone		Thiosemicarbazide		Tryptophane	
	PO_4H_3	R.A.	PO_4H_3	R.A.	PO_4H_3	R.A.	PO_4H_3	R.A.
BMB - 30 mn	0,04	0,10	0,15	0,56	0,47	0,46	0,05	0,18
- 60 mn	0,16	0,24	0,32	0,64	0,73	0,51	0,09	0,25

La phénazone et le thiosemicarbazide sont nettement actifs. Mais, contrairement à ce que nous avons obtenu avec PPD, les colorations ne sont pas entièrement développées après 30 minutes en milieu arsénicosulfurique. Il y a donc, entre PPD et PPDM, la même différence de cinétique qu'entre le diacétyle et la diacétylmonoxime.

CONCLUSION

Cette étude des réactions colorées urée-phénylpropanedione et urée-phénylpropanedione-monoxime a mis en évidence des caractères particuliers à celles-ci :

- nécessité d'un grand excès de réactif dicétonique non définissable par suite de la limitation imposée par l'insolubilité de la dicétone dans le milieu acide,
- grande sensibilité à la présence d'acide sulfurique (concentration à maintenir entre 0,5 et 1 ml) alors qu'au contraire les quantités de PO_4H_3 ou de réactif arsénicosulfurique peuvent varier plus largement sans modifier brutalement l'intensité des colorations. Nous avons fait remarquer aussi l'effet "tampon" d' AsO_4H_3 qui remédie comme avec la diacétylmonoxime aux inconvénients de l'acide sulfurique.
- cinétique lente même en milieu arsénicosulfurique. Les oxydants et les sels métalliques semblent moins capables de la modifier que les substances intensifiantes en particulier la phénazone et le thiosemicarbazide. Par contre tous ces composés provoquent une augmentation très nette de l'intensité des colorations.

La dicétone et sa monoxime donnent des réactions très voisines. Les différences se limitent à la nécessité d'une acidité légèrement plus grande avec la monoxime (3,5 au lieu de 3 ml avec PO_4H_3), d'une cinétique un peu plus lente, à des colorations en général moins intenses avec la phénylpropanedione-monoxime.

Par comparaison aux réactions colorées données par le diacétyl et ses oximes, il faut, avec la phénylpropanedione et ses oximes, une acidité plus grande, une quantité supérieure de réactif dicétonique, un temps de chauffage plus long. De plus la sensibilité de la réaction est plus faible. Ces inconvénients sont partiellement levés par l'addition des substances intertérantes habituelles en particulier par l'emploi de thiosemicarbazide en milieu arsénicosulfurique.

Dans la quatrième partie de ce Travail, partie groupant les applications analytiques dans les milieux biologiques, nous proposerons une technique avec la phénylpropanedione-monoxime en milieu phosphorique. Cette réaction est plus spécifique pour l'urée (voir chapitre deuxième, troisième partie).

Mais l'effet des protéines sur la cinétique de la réaction urée-phénylpropanedione-monoxime que nous avons mis en évidence dès 1962 (G. SIEST) ne nous a plus semblé, après cette étude détaillée des réactions colorées dérivés carbamidés-dicétones, mériter une application plus étendue.

CHAPITRE SEPTIEME

ETUDE DE LA PHOTOSENSIBILITE ET DE LA PHOTOSTABILITE DES REACTIONS COLOREES UREE -ALPHA-DICETONES

Nous avons volontairement omis de parler de photostabilité dans notre étude expérimentale, pour ne pas la surcharger. Mais comme la majorité des auteurs, dès nos premiers essais avec la phénylpropanedionemonoxime et la diacétylmonoxime, nous avons été gênés par l'instabilité des colorations laissées à la lumière du jour. Les essais qui précèdent ont donc été effectués après avoir pris les précautions nécessaires. Nous avons pensé qu'il valait mieux rassembler ici nos observations concernant la photostabilité. Ainsi groupés, les résultats obtenus dans ces expériences nous permettront de mieux juger les diverses techniques et les améliorations qui ont été proposées.

C'est ORMSBY en 1942 qui a signalé le premier l'influence de l'éclairement : la lumière directe du soleil affaiblissait rapidement les colorations développées par addition de persulfate et au contraire provoquait une nette augmentation de leur intensité pendant le chauffage. Le rayonnement lumineux semblait donc avoir des effets opposés suivant le stade de développement de la réaction colorée auquel il intervenait. Après ORMSBY, de nombreux auteurs ont voulu améliorer la réaction colorée du point de vue stabilité à la lumière. Ils ont proposé :

- le chauffage à l'autoclave (WEARNE 1958, FORSELL et PALVA 1960)
- l'addition de sels métalliques (BEALE et CROFT 1961)
- l'addition de tryptophane (PECHAR et coll. 1954), de thiosemicarbazide (COULOMBE et FAVREAU 1963), de glucuronolactone (MOMOSE et coll. 1965), de phénazone (CERIOTTI 1963), de protéines (TIM-MERMANS 1962).

D'autres ont prétendu avoir des colorations insensibles à la lumière (KAWERAU 1946, ELODI 1954, WHITE 1946, KULHANEK et coll. 1963) alors que, finalement la majorité préférerait prendre des dispositions pour se mettre à l'abri d'un éclairage intense.

Parmi la centaine de techniques proposées et donc les nombreuses modalités opératoires et la grande variété de substances introduites dans la réaction, il est difficile de faire ressortir ce qui peut réellement améliorer la photostabilité des colorations.

Mais surtout aucune intensité lumineuse n'étant identique et les termes utilisés pour la décrire vagues et imprécis. (" lumière du jour, lumière normale de laboratoire, lumière vive ou diffuse, lumière d'une grosse ampoule électrique "), il n'y avait pas de comparaison possible. Seuls BERAN et BERKA (1965)

ont mieux précisé leurs conditions (deux ampoules de 60 watts distantes de 25 cm).

Nous avons alors examiné, dans des conditions comparables, l'influence de chaque facteur ou groupe de facteurs étudiés dans les chapitres précédents.

Conditions opératoires suivies pour cette étude

Les proportions de réactif, sauf précisions contraires, sont celles définies précédemment. Pour apprécier la photosensibilité et la photostabilité, nous avons placé les mélanges réactionnels à différentes intensités lumineuses. Afin de pouvoir apprécier quantitativement les variations dues à la lumière, celles-ci ne devaient être ni trop faibles, ni trop importantes. Nos conditions d'exposition à la lumière étaient donc variables en temps et en intensité : par exemple, une coloration très résistante à la lumière devait être placée en plein soleil, alors que d'autres plus sensibles étaient laissées à l'intérieur du laboratoire à différents emplacements plus ou moins éclairés. L'utilisation d'ampoules électriques fournissant une lumière plus reproductible n'est valable que pour des colorations très photosensibles.

Nous n'avons donc tiré de conclusions que de résultats provenant d'essais effectués simultanément, c'est-à-dire dans des conditions de luminosité identique.

I - PHOTSENSIBILITE DES COLORATIONS PENDANT LE CHAUFFAGE

ORMSBY (1942) ainsi que nous l'avons déjà signalé, avait obtenu des colorations plus intenses lorsqu'elles étaient développées dans un bain-marie bouillant placé au soleil. LECLERC et SCHWARZ (1957) travaillant avec le diacétyl, laissaient la réaction se développer lentement à température ordinaire : les colorations obtenues au jour étaient d'intensité supérieure à celles développées à l'obscurité. La lumière interfère donc dans le développement des réactions colorées d'où les recommandations trouvées dans la littérature de placer le bain-marie dans un endroit éloigné de la fenêtre (BARKER 1944 avec la diacétylmonoxime) ou même à l'obscurité (ARCHIBALD 1945 avec la phénylpropanedionemonoxime, LE MAR et BOOTZIN 1957 avec le diacétyl).

Nous avons utilisé deux bain-marie, l'un en verre placé au soleil, l'autre à l'obscurité et nous avons obtenu les résultats suivants en milieu arsénicosulfurique :

- la lumière solaire intensifie la réaction colorée donnée par le diacétyl, inhibe celle de la diacétylmonoxime et se montre sans action sur celle obtenue avec la diacétyldioxime

- dans le cas de la diacétylmonoxime, un excès de réactif ou l'addition de phénazone, limite l'effet de l'éclairage : l'inhibition qui est de 64 % dans la réaction habituelle (1 ml de diacétylmonoxime M/10) n'est plus que de 36 %

avec 1 ml de diacétylmonoxime M/2 et de 20 % après addition de phénazone (0,5 ml de solution M/10).

En développant la réaction à 37° on retrouve un comportement similaire, quoique à des degrés différents. En effet, à cette température la réaction se développant lentement, l'action de la lumière se manifeste plus longtemps et les colorations sont donc encore plus sensibles à l'éclairement.

La lumière interfère donc nettement dans le développement de la réaction colorée. Les réactifs et les modalités opératoires interviennent dans cette photostabilité. Cependant, nous avons vérifié que l'éclairement habituel à l'intérieur du laboratoire, (lumière du jour ou lumière artificielle) était sans effet sur le développement des réactions colorées au bain-marie bouillant.

II - PHOTOSTABILITE DES REACTIONS COLOREES APRES LEUR DEVELOPPEMENT

Cette étude a été effectuée en exposant les tubes contenant les mélanges réactionnels, colorés et refroidis, à des éclaircissements d'intensité et de temps variables.

1) Influence du réactif acide sur la photostabilité

Les réactions développées en milieu chlorhydrique (ROSENTHAL 1955), sulfurique (BARKER 1944), sulfurique-phosphorique (ARCHIBALD 1945), arsénicosulfurique (ANDERSEN 1959), sulfurique-perchlorique (IUCHI 1958), phosphorique-chlorhydrique (BERAN et BERKA 1965) sont toutes sensibles à la lumière. De prime abord aucun acide ou mélange acide ne semble plus favorable qu'un autre, il ne semble pas qu'une étude comparative ait été faite.

a) Nature des acides

Nous avons comparé la photostabilité des réactions colorées obtenues en milieu phosphorique, sulfurique, chlorhydrique, sulfosalicylique, paratoluènesulfonique, arsénique et arsénicosulfurique.

Dans le tableau suivant, nous présentons à titre d'exemple, les résultats obtenus avec quatre de ces acides dans les conditions opératoires définies aux chapitres premier et deuxième, et 30 minutes de bain-marie bouillant.

Tableau 44 : Influence de la nature des acides sur la photostabilité des colorations

	Acide phosphorique	Acide sulfosalicylique (60 p. 100)	Acide paratoluène- sulfonique (50 p. 100)	Acide arsénique (40 p. 100)
1ère lecture	1,07	0,54	0,67	0,45
Exposition de 15 mn au soleil	0,53	0,03	0,46	0,41
Deuxième exposition de 15 mn au soleil	0,32	0	0,35	0,41

Comme le montre ce tableau, la réaction colorée est stable en milieu arsénique. Par contre, en milieu paratoluènesulfonique et phosphorique, il y a affaiblissement partiel qui devient presque total en milieu sulfosalicylique.

Dans les mêmes conditions, SO_4H_2 et HCl donnent des réactions colorées encore beaucoup plus sensibles à la lumière.

Il faut donc retenir la bonne stabilité des colorations développées en milieu arsénique.

b) Concentration en acide

Dans le tableau suivant figurent les résultats obtenus avec différentes concentrations de PO_4H_3 (bain-marie bouillant 60 minutes).

Tableau 45 : Influence de la concentration en acide sur la photostabilité

PO_4H_3 ml	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
1ère lecture	0,11	0,27	0,63	0,80	0,86	0,82	0,73
2ème lecture après 90 mn d'exposition au soleil	0	0	0,22	0,50	0,70	0,86	0,80

Les colorations sont les moins abaissées dans le milieu le plus acide. Une grande quantité de réactif acide est donc un facteur de stabilité.

c) Influence du temps de chauffage

Nos essais étant effectués avec des temps de chauffage variables, nous avons remarqué que les colorations insuffisamment développées sont les moins stables. Cette instabilité des réactions colorées développées par un temps de chauffage court s'exprime de façon différente suivant la nature des milieux acides :

- dans les milieux phosphorique et chlorhydrique (qui nécessitent un temps de chauffage très long pour un développement complet des colorations) la lumière manifeste d'abord une action intensifiante puis dans un deuxième temps les colorations s'affaiblissent

- dans les milieux arsénicosulfurique, paratoluènesulfonique, sulfosalicylique ou sulfurique, il y a seulement un affaiblissement des colorations.

Le tableau suivant montre ces deux types de comportement. Les décolorations sont dans tous les cas en raison inverse du temps de chauffage. Un temps de chauffage prolongé est donc aussi un facteur de stabilité à la lumière.

Tableau 46 : Photostabilité des colorations en fonction du temps de chauffage

Temps de BMB en mn	10	20	30	40	50	60
I. Milieu phosphorique						
1ère lecture	0,06	0,12	0,21	0,29	0,33	0,40
2ème lecture après 30 mn au soleil	0,23	0,40	0,44	0,50	0,51	0,55
3ème lecture après une 2ème exposition de 60 mn au soleil	0,09	0,29	0,34	0,41	0,40	0,44
II. Milieu arsénico- sulfurique						
1ère lecture	0,55	0,66	0,62	0,66	0,63	0,61
2ème lecture après 30 mn au soleil	0,05	0,11	0,16	0,25	0,31	0,36
3ème lecture après une 2ème exposition de 60 mn au soleil	0	0,01	0,02	0,05	0,05	0,07

2) Influence du réactif dicétonique

Les réactions colorées développées avec le diacétyl (NATELSON et coll. 1951, DICKENMANN et coll. 1954, LE MAR et BOOTZIN 1957), la diacétylmonoxime (BARKER 1944, ANDERSEN 1959, ROSENTHAL 1955, ARCHIBALD 1944, etc . . .), la phénylpropanedione (DICKENMANN 1954) ou la phénylpropanedionemonoxime (ARCHIBALD 1945, PERROT et VELAY 1958) sont toutes plus ou moins rapidement décolorées par la lumière. A l'exception de DICKENMANN et coll. (1954) qui signalent une meilleure résistance de la réaction urée-phénylpropanedione que de la réaction urée-diacétyl, aucun résultat comparatif n'a été à notre connaissance présenté dans la littérature.

C'est pourquoi nous avons d'abord étudié comparativement la photostabilité du diacétyl et de ses oximes puis de la diacétylmonoxime et de la phénylpropanedionemonoxime dans les conditions trouvées les plus favorables précédemment.

Nous avons remarqué :

- que les colorations étaient de plus en plus stables à la lumière en passant du diacétyl à la diacétylmonoxime puis à la diacétyldioxime : affaiblissement respectivement de 60, 40 et 20 %.

- qu'une élévation de la concentration de diacétylmonoxime augmente la stabilité des réactions colorées (l'affaiblissement passe de 50 % avec 1 ml de diacétylmonoxime M/10, à 5 % avec 1 ml de diacétylmonoxime M/2)

- que à temps de chauffage égal, la réaction urée-diacétylmonoxime est moins sensible à la lumière que la réaction urée-phénylpropanedionemonoxime (décoloration presque totale de cette dernière réaction et 60 % seulement avec la diacétylmonoxime).

Pour la photostabilité des colorations obtenues, les réactifs se rangent donc dans l'ordre décroissant : dioxime, monoxime, dicétone. Ces différences pourraient être dues à la libération d'hydroxylamine dans le milieu acide, ce que nous avons vérifié (tableau 47).

Tableau 47 : Influence de l'hydroxylamine (et du nitrite) sur la photostabilité de la réaction colorée urée-diacétylmonoxime développée en milieu arsénicosulfurique

Hydroxylamine M/10 ml	0	0,5	2		
Nitrite M/100 ml	0			0,5	2
1ère lecture	0,82	0,76	0,52	0,57	0,19
2ème lecture après 60 mn d'exposition à la lumière	0,56	0,62	0,47	0,30	0,10
3ème lecture après 15 mn d'exposition au soleil	0,10	0,28	0,33	0	0

L'hydroxylamine améliore nettement la stabilité de la réaction colorée à la lumière, l'affaiblissement qui est de 31 % pour le témoin, n'est plus que de 18 % avec 0,5 ml d'hydroxylamine M/10. Les différences de photostabilité remarquées avec les réactions urée-diacétyl, diacétylmonoxime, diacétyldioxime peuvent donc être dues à l'absence ou à la présence d'hydroxylamine en quantité croissante dans le milieu. Cet effet ne se retrouve pas avec le nitrite, composé réducteur aussi.

3) Influence de substances interférentes

a) Oxydants

On a dit que l'addition de persulfate (BARKER 1944) ou de chloramine (GIRARD et DREUX 1958) après le chauffage et celle d'AsO₄H₃ (ANDERSEN 1959) ou ClO₄H (IUCHI 1958) avant le chauffage ne permettait pas d'avoir des colorations photostables.

Nos essais avec des oxydants introduits avant ou après le chauffage (chlorate et chloramine) ont mis en évidence que les colorations obtenues en présence de ces composés sont encore plus sensibles à la lumière. Par contre, $\text{AsO}_4 \text{H}_3$ ajouté à $\text{SO}_4 \text{H}_2$ donne à la réaction urée-diacétylmonoxime une meilleure photostabilité.

b) Sels métalliques

BEALE et CROFT (1961) ajoutaient du manganèse dans leur mélange réactionnel complexe pour éviter la photosensibilité : la réaction colorée parfaitement stable au soleil se décolorait pourtant de 5 % par heure à l'obscurité ! L'addition de sel ferrique ne permet pas d'avoir une réaction photostable (RICHTER et LAPOINTE 1962).

Nos essais, effectués en milieux phosphorique et chlorhydrique avec les métaux trouvés actifs (chapitre troisième) sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 48 : Influence des métaux sur la photostabilité des colorations

	Milieu phosphorique			Milieu chlorhydrique		
	Témoin	Fer M/2	Manganèse M/10	Cuivre M/500	Manganèse M/10	Témoin
1ère lecture	0,86	0,42	1,2	0,30	1,1	0,90
2ème lecture après 2h d'exposition à la lumière	0,98	0,39	1,30	0,23	0,75	0,05
3ème lecture après une 2ème exposition de 90 mn au soleil	0	0	0,30	0	0	0

Les métaux, en particulier le manganèse, améliorent surtout en milieu chlorhydrique, le comportement des réactions colorées à la lumière. Mais, même le manganèse, ne peut empêcher une décoloration partielle.

c) Influence des solvants organiques

Ces composés modifient peu la photostabilité des réactions colorées. L'introduction de 1 ml d'éthanol, d'éthylèneglycol ou 0,5 ml d'acétone a pour conséquence de limiter l'affaiblissement à 30, 26 et 37 % au lieu de 51 % pour la réaction témoin urée-diacétylmonoxime développée en milieu arsénicosulfurique.

d) Influence des substances intensifiantes

Nous avons fait remarquer au début de ce chapitre que ces composés ont été souvent utilisés parce qu'ils amélioraient la photostabilité.

C'est pourquoi nous avons étudié plus en détails l'influence du thiosemicarbazide, du tryptophane, de la phénylhydrazine, de la glucuronolactone et de la phénazone.

Dans une première série d'essais nous avons comparé les effets de ces quatre composés en milieu arsénicosulfurique ; ils se classent dans l'ordre suivant pour leurs propriétés stabilisatrices :

- . phénylhydrazine M/ 1000
- . phénazone M/ 10
- . thiosemicarbazide M/ 500
- . tryptophane M/ 2000
- . glucuronolactone M/ 10

Mais , même avec la phénylhydrazine, la résistance des colorations à une lumière intense n'est pas absolue. Cependant ces composés améliorent nettement cette résistance.

L'obligation de préparer la phénylhydrazine en solution extemporanée nous a fait rejeter une étude plus approfondie de cette substance. Le thiosemicarbazide, le tryptophane et la glucuronolactone ont une influence moins grande que la phénazone sur la photostabilité de la réaction colorée, et leur action quoique très utile, suscite donc un moindre intérêt. La glucuronolactone, en particulier, légèrement active en milieu arsénicosulfurique ou sulfosalicylique ne modifie pas le comportement des réactions colorées développées en milieu phosphorique (ou paratoluènesulfonique) : l'effet stabilisateur attribué par MOMOSE et coll. (1965) à ce composé a pour origine la nature du milieu acide (PO_4H_3) qui, ainsi que nous l'avons précisé, favorise davantage la photostabilité que le milieu arsénicosulfurique utilisé comme terme de comparaison par ces auteurs.

Nous avons donc plus particulièrement étudié l'influence de la phénazone, composé très actif sur l'intensité et la stabilité des colorations.

En milieu arsénicosulfurique, la phénazone améliore déjà la photostabilité à la dose de 0,5 ml de solution M/ 500. L'effet est maximum à partir de 0,1 ml de solution M/ 10, et se maintient jusqu'à 1,5 ml. La quantité habituellement utilisée (0,5 ml de solution M/ 10) est donc valable, et c'est avec celle-ci que nous avons continué nos essais.

Dans le tableau ci-après, nous avons rassemblé les résultats obtenus dans quatre milieux acides.

Tableau 49 : Influence de la phénazone sur la photostabilité des colorations dans différents milieux acides

	Milieu paratoluène- sulfonique		Milieu sulfosalicylique		Milieu sulfurique		Milieu arsénico- sulfurique	
	DM M/ 2		DM M/ 10		DM M/ 10		DM M/ 10	
Phénazone M/ 10ml	0	0,5	0	0,5	0	0,5	0	0,5
1ère lecture	0,18	1,5	0,46	1,7	0,25	1,45	0,10	1,55
2ème lecture après 60 mn d'exposition à la lumière	0,15	1,5	0,01	1,60	0,01	1,35	0,02	1,45
3ème lecture après 60 mn d'exposition au soleil	0,06	1,4	0	0,52	0	0,20	0	0,67

Dans les quatre milieux acides l'effet photoprotecteur de la phénazone est très net : alors que, à l'exception du milieu paratoluènesulfonique, en l'absence de phénazone, il y a décoloration complète, l'addition de 0,5 ml de solution M/ 10 de ce composé permet une résistance presque totale à la décoloration par la première exposition à la lumière. Nous pouvons remarquer aussi un meilleur comportement en milieu arsénicosulfurique que sulfurique seul, Nous avons déjà noté également la valeur du milieu paratoluènesulfonique du point de vue stabilité à la lumière. Il ne faut pas oublier qu'avec ce milieu il est nécessaire d'introduire une plus grande quantité de diacétylmonoxime (voir chapitre deuxième), cette quantité supplémentaire étant elle-même un facteur de stabilité.

Nous avons vérifié en effet en milieu arsénicosulfurique et en présence de phénazone que l'introduction d'une quantité supérieure de diacétylmonoxime et aussi d'AsO₄ H₃ améliorerait davantage la résistance des colorations à la lumière :

- alors que 30 minutes d'exposition au soleil affaiblissent de 50 % la coloration obtenue avec 6 µg d'urée (1 ml de diacétylmonoxime M/ 10) 2 ml de réactif arsénicosulfurique, 0,5 ml de phénazone M/ 10 dans un volume total de 6 ml et 30 minutes de BMB), l'introduction supplémentaire de 1 ml d'AsO₄ H₃ à 40 % limite l'affaiblissement à 23 % et l'utilisation d'une quantité cinq fois plus grande de diacétylmonoxime le réduit à 5 %.

L'effet de la phénazone est très net aussi en milieu phosphorique, simple ou phosphoferrique permettant d'obtenir des colorations très peu sensibles à la lumière.

4) Influence de la température de développement de la réaction

a) Photostabilité après chauffage sous pression

Certains auteurs (WEARNE 1958, FORSELL et PALVA 1960) avaient préconisé le chauffage sous pression pour améliorer la stabilité. Des essais effectués en milieux arsénicosulfurique et phosphorique, et à l'autoclave, nous permettent d'affirmer que cette modalité opératoire n'a d'autre influence sur la photostabilité que celle correspondant à un temps de chauffage à 100° prolongé. Ce procédé n'a donc pas d'intérêt pratique.

b) Photostabilité des colorations développées à 37 ou 55°

Les colorations obtenues dans ces conditions sont plus sensibles à la lumière que celles développées à 100°.

Les résultats obtenus en fonction des acides, des dicétones et des composés interférents restent valables et confirment les observations de LECLERC et SCHWARZ (1957).

CONCLUSION

Cette étude générale de la photosensibilité a mis en évidence que tous les facteurs impliqués dans le développement des réactions colorées urée-alpha-dicétones interviennent sur la sensibilité des colorations à la lumière.

La lumière peut agir pendant le développement des réactions colorées (photosensibilité pendant le chauffage). Cette action varie avec le réactif (diacétyle, diacétylmonoxime, diacétyldioxime). Les réactions données par la diacétyldioxime sont moins sensibles. L'action de la lumière est plus importante lorsque les réactions colorées se développent lentement à température inférieure à 100°.

Mais la lumière agit surtout sur les colorations après le chauffage. La photostabilité est une qualité que nous avons cherché à définir. Un facteur nous semble primordial : le temps de chauffage. Plus il est long, plus la coloration est stable. A ce facteur, se surajoute l'influence des réactifs acides et dicétoniques et des substances interférentes.

La photostabilité est en effet variable avec la nature des acides. Nous pouvons classer les acides étudiés dans l'ordre croissant suivant pour la photostabilité des colorations obtenues : acides sulfurique, chlorhydrique, sulfosalicylique, arsénicosulfurique, phosphorique, paratoluènesulfonique et arsénique. Etant donnée l'action stabilisante de AsO_4H_3 , son addition à SO_4H_2 rend les colorations développées dans ce milieu plus résistantes à la lumière.

La photostabilité varie également avec la nature du réactif dicétonique utilisé. La résistance à la lumière s'accroît de la dicétone à la monoxime puis à la dioxime. Nous avons mis en évidence que l'hydroxylamine libérée par ces oximes pourrait être responsable des différences observées. L'addition d'hydroxylamine dans le milieu améliore en effet la photostabilité. Les colorations données par le diacétyle et ses oximes sont plus stables que celles obtenues par la phénylpropanedione et ses oximes. De ces essais il ressort que l'utilisation de la diacétyldioxime est souhaitable comme réactif dicétonique. Mais la solubilité très faible de la dioxime dans l'eau nécessite la préparation d'une solution alcoolique ou acétonique. Or ces solvants interfèrent dans la réaction. Nous avons donc préféré garder la diacétylmonoxime, tout en recherchant des dioximes solubles dans l'eau (voir deuxième partie).

Enfin plus les concentrations de l'acide et de la monoxime sont élevées, plus la stabilité est grande.

Les différents adjuvants introduits dans le milieu réactionnel interviennent aussi sur la photostabilité : les oxydants, chlorate introduit avant le chauffage ou chloramine ajoutée après le chauffage n'améliorent pas la sensibilité des

colorations à la lumière. Par contre, l'addition de sels métalliques (en particulier de manganèse) et de substances " intensifiantes " permet de limiter l'action de la lumière. Nous avons particulièrement étudié l'influence de la phénazone : en présence de ce composé, les réactions colorées obtenues dans différents milieux acides sont très stables même au soleil.

En conciliant tous les facteurs, nous avons retenu comme modalité opératoire donnant des colorations très peu sensibles à la lumière :

- urée prise d'essai
- réactif arsénicosulfurique 2 ml
- diacétylmonoxime M/2 1 ml
- phénazone M/10 0,5 ml
- eau distillée q.s.p. 6 ml

Bain-marie bouillant 30 mn.

CONCLUSIONS DE LA PREMIERE PARTIE

L'étude des réactions colorées de l'urée avec la diacétylmonoxime, le diacétyl, la diacétyldioxime, la phénylpropanedione et la phénylpropanedionemonoxime a montré que la nature et la concentration des acides sont des facteurs très importants qui déterminent l'intensité, la cinétique et la stabilité des complexes colorés.

Nous avons mis en évidence que l'effet des oxydants, des sels métalliques, des solvants cétoniques et de diverses substances ajoutées dans le milieu réactionnel se manifeste en général par une modification de la cinétique de la réaction, puis de l'intensité.

Il est intéressant de comparer les réactions obtenues avec le diacétyl, la diacétylmonoxime et la diacétyldioxime. Nous pouvons observer trois différences essentielles :

- la quantité d'acide phosphorique la plus favorable avec la diacétyldioxime (3 ml) est supérieure à celle trouvée avec la diacétylmonoxime (2,5 ml) et avec le diacétyl (2 ml)
- la cinétique de la réaction est de rapidité croissante du diacétyl à la diacétylmonoxime et la diacétyldioxime
- la photostabilité des colorations obtenues décroît de la diacétyldioxime à la diacétylmonoxime et au diacétyl

La nécessité d'une hydrolyse préalable des oximes et la formation dans ce cas d'hydroxylamine suffisent à expliquer les différences observées. Ces différences se retrouvent avec la phénylpropanedione et la phénylpropanedionemonoxime.

Par contre l'effet des oxydants, des sels métalliques, des solvants ou des " intensifiants " est similaire avec les dicétones et leurs oximes.

En comparant d'autre part les réactions colorées du diacétyl et de ses oximes, et de la phénylpropanedione et de sa monoxime, on remarque essentiellement, en plus de la variation de coloration, une cinétique plus lente avec la phénylpropanedione et une plus grande sensibilité à la lumière.

En vue d'applications biologiques, nous ne retiendrons ni les alpha-dicétones instables, ni les dioximes difficilement solubles ; nous proposerons dans la Quatrième Partie de ce Travail différentes techniques avec la diacétylmonoxime et la phénylpropanedionemonoxime.

DEUXIEME PARTIE

NOUVELLES REACTIONS COLOREES DES DERIVES CARBAMIDES AVEC DES DICETONES CYCLANIQUES

En étudiant les réactions colorées que donnent en milieu acide les dérivés carbamidés avec les alpha-dicétones aliphatiques, nous avons été amené à essayer des dicétones cycliques. C'est en effet, en voulant améliorer la photostabilité des colorations précédentes et en tentant d'éviter pour leur développement, le chauffage au bain-marie bouillant, que nous avons mis en évidence de nouvelles réactions colorées entre les dérivés carbamidés et des dicétones cycliques.

La première hypothèse repose sur la comparaison des qualités des colorations obtenues avec les alpha-dicétones, leurs monoximes et leurs dioximes : nous avons constaté une meilleure photostabilité avec les dioximes. Mais ces composés (diacétyldioxime, phénylpropanedionedioxime) sont pratiquement insolubles dans l'eau et les solvants nécessaires pour les dissoudre interfèrent dans les réactions. Nous avons donc cherché des dioximes solubles dans l'eau et nous avons pensé aux cyclanedionedioximes utilisées pour le dosage colorimétrique du nickel (VOTER et BANKS 1949) :

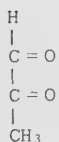
- cyclohexanedionedioxime ou nioxime et son dérivé 4-méthyl (FERGUSON et BANKS 1951, MONNIER et HAERDI 1950)
- cycloheptanedionedioxime ou heptoxime (FERGUSON et BANKS 1951, GILLIS et coll. 1954).

La deuxième hypothèse trouve son origine dans le travail de PIEN et coll. (1936, 1937). Ces auteurs condensaient le diacétyl avec des diamines aromatiques en milieu acide et à la température du laboratoire. Le développement rapide d'une réaction colorée à température basse est une qualité que nous recherchions pour l'urée. Les amines utilisées par PIEN (toluènediamine, diaminobenzidine) différaient de l'urée en particulier par leur structure cyclique, les deux fonctions aminées étant directement fixées sur deux carbones contigus du noyau aromatique. Nous avons pensé qu'il y avait peut-être dans cette réaction, une réciprocité dont nous pourrions tirer profit, à savoir condenser l'urée, diamine acyclique, avec des dicétones cycliques, les deux fonctions cétoniques étant aussi fixées sur deux carbones contigus d'un noyau. C'est ainsi que nous avons entrepris des essais avec la cyclohexanedione et les dioximes de la cyclohexanedione, de la 4-méthyl-cyclohexanedione et de la cyclohexanedione dont les formules sont présentées ci-après.

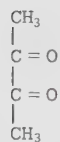
Les deux hypothèses que nous avons posées se sont révélées exactes :

- la cycloheptanedionedioxime développe par chauffage à 100°, une coloration jaune d'or photostable

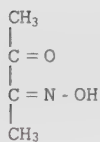
- la cyclohexanedione et sa dioxime donnent des colorations violettes se développant rapidement à température basse (37°).



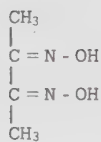
METHYL-
GLYOXAL



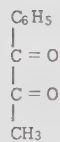
DIACETYLE



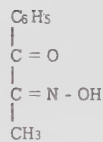
DIACETYLMONOXIME



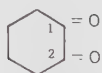
DIACETYLDIOXIME



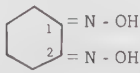
PHENYLPRO-
PANEDIONE



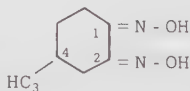
PHENYLPROPANE
DIONEMONOXIME



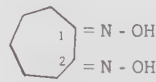
CYCLOHEXA-
NEDIONE



NIOXIME



4-METHYL-NIOXIME



HEPTOXIME

ALPHA DICETONES ETUDIEES DONNANT UNE REACTION POSITIVE AVEC L'UREE

CHAPITRE PREMIER

ETUDE DE LA REACTION UREE-HEPTOXIME

La cycloheptanedionedioxime ou heptoxime (PM = 156) se présente sous la forme d'une poudre blanche assez soluble dans l'eau (4,7 g p. 1000 à 20°).

En ajoutant à une prise d'essai d'urée et d'heptoxime, différents acides, il se développe par chauffage au bain-marie bouillant, une coloration jaune d'or, Le graphique 34 représente le spectre d'absorption de cette réaction colorée dont le maximum est à 475 nm.

Des essais préliminaires ont mis en évidence un développement assez lent de la réaction colorée et la nécessité de chauffer au bain-marie bouillant la réaction mettant plusieurs jours pour se développer à température ordinaire. Nous avons remarqué également des différences très nettes d'intensité suivant le milieu acide utilisé et une sensibilité relativement faible (100 à 200 μ g d'urée dans la prise d'essai).

Nous avons publié en 1961, les premiers résultats obtenus. L'étude de la réaction urée-heptoxime que nous présentons a été effectuée dans des conditions comparables à celles utilisées dans la Première Partie de ce Travail. Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- urée 100 à 200 μ g
- acide ou réactif acide n ml
- solution aqueuse d'heptoxime à
0,4 % n ml
- eau distillée q.s.p. 6 ml

Bain-marie bouillant. Refroidir 10 minutes

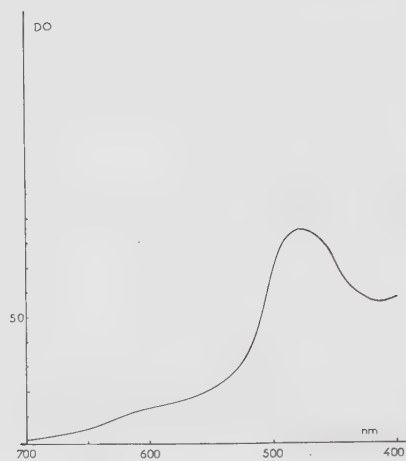
Lecture au spectrophotomètre à 475 nm

Cuve de 1 cm

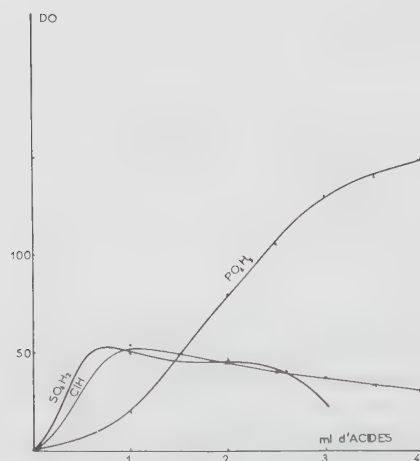
I - INFLUENCE DES ACIDES

Les acides phosphorique, chlorhydrique et sulfurique conviennent au développement de la réaction urée-heptoxime. L'acide perchlorique est actif mais les résultats infidèles obtenus dans la Première Partie de ce Travail ne nous ont pas incité à poursuivre les essais. Les acides trichloracétique, sulfosalicylique, paratoluènesulfonique et arsénique ne permettent le développement que de réactions colorées très peu intenses : 200 μ g d'urée donnent des colorations faibles (densité optique inférieure à 0,1).

Le milieu citrique ne semble pas permettre la formation d'un complexe coloré : même avec 1 mg d'urée nous n'avons pas obtenu de coloration après 60 minutes de bain-marie bouillant. Il en est de même avec l'acide nitrique.



Graphique 34. Spectre d'absorption de la réaction urée-heptoxime



Graphique 35. Réaction urée-heptoxime
Intensité en fonction de la concentration en acide

a) Concentration optima en acides phosphorique et sulfurique

Le graphique 35 met en évidence qu'il faut une forte concentration en acide phosphorique pour avoir une coloration intense. Le plus grand volume (4 ml) qu'il soit possible d'utiliser n'est pas encore suffisant.

En milieu chlorhydrique par contre 1 ml est la quantité la plus favorable. Cependant les colorations sont nettement moins intenses dans ce dernier milieu. Les colorations ayant été développées entre 30 et 60 minutes de bain-marie bouillant, nous pouvons aussi remarquer le développement lent de cette réaction colorée.

En milieu sulfurique, les colorations sont d'intensité très voisine de celles obtenues en milieu chlorhydrique. La concentration la plus favorable est 0,75 à 1 ml d'acide sulfurique pour 6 ml de volume total.

Avec ces concentrations d'acide, nous avons précisé la cinétique de la réaction urée-heptoxime (graphique 36).

Les courbes présentées ont été obtenues avec 100 μ g d'urée en milieu phosphorique et 200 μ g d'urée en milieu sulfurique et chlorhydrique. Quoiqu'un peu plus rapidement développée avec l'acide phosphorique, cette réaction colorée ne se développe que lentement et les colorations s'intensifient encore nettement après 60 minutes de chauffage à 100°.

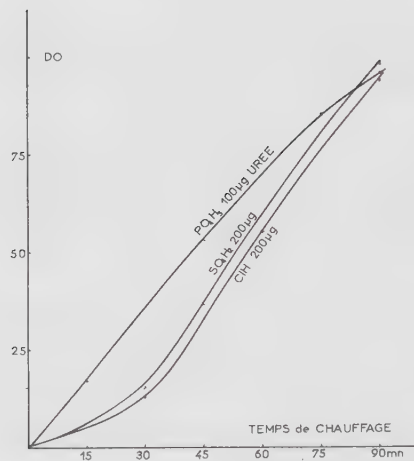
b) Essai d'utilisation simultanée de AsO_4H_3 et SO_4H_2

Pour tenter d'améliorer la cinétique de la réaction colorée, c'est-à-dire obtenir une coloration entièrement développée par un temps de chauffage court, nous avons effectué d'abord des essais avec le réactif arsénicosulfurique précédemment défini (10 g d' AsO_4H_3 dans l'acide sulfurique dilué au demi).

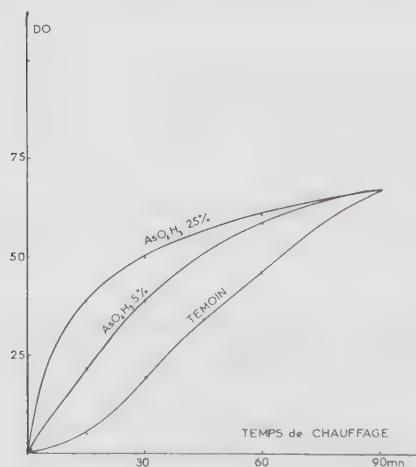
Le tableau 49 présente l'intensité des colorations obtenues avec 200 μ g d'urée et 1 ml d'heptoxime à 0,4 % en faisant varier la quantité de ce réactif acide.

Tableau 49 : Intensités de la réaction urée-heptoxime en fonction de la quantité de réactif arsénicosulfurique

R.A. ml	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
BMB - 30 mn	0,11	0,17	0,23	0,29	0,37	0,43	0,47
60 mn	0,44	0,51	0,52	0,52	0,58	0,61	0,60



Graphique 36. Réaction urée-heptoxime
Cinétique en milieu phosphorique, sulfurique et chlorhydrique



Graphique 37. Réaction urée-heptoxime
Cinétique en milieu sulfurique en présence d' $\text{AsO}_4 \text{H}_3$

A 30 minutes de bain-marie bouillant l'intensité croît avec la quantité de réactif.

A 60 minutes l'intensité est maxima à 3,5 ml.

La comparaison des résultats obtenus à 30 et 60 minutes montre que la cinétique de la réaction est accélérée en augmentant la quantité d'acide.

L'acide arsénique est responsable de ce résultat (graphique 37).

Nous avons cherché à préciser les concentrations les meilleures des deux acides.

Tableau 50 : Intensité de la réaction urée-heptoxime en fonction de quantité variable d' AsO_4H_3 et de SO_4H_2

SO_4H_2 50 %	1 ml					2 ml				
AsO_4H_3 100 g % (p/v) ml	0	0,5	1	1,5	2	0	0,5	1	1,5	2
BMB - 30 mn	0,13	0,15	0,15	0,16	0,15	0,16	0,28	0,33	0,33	0,31

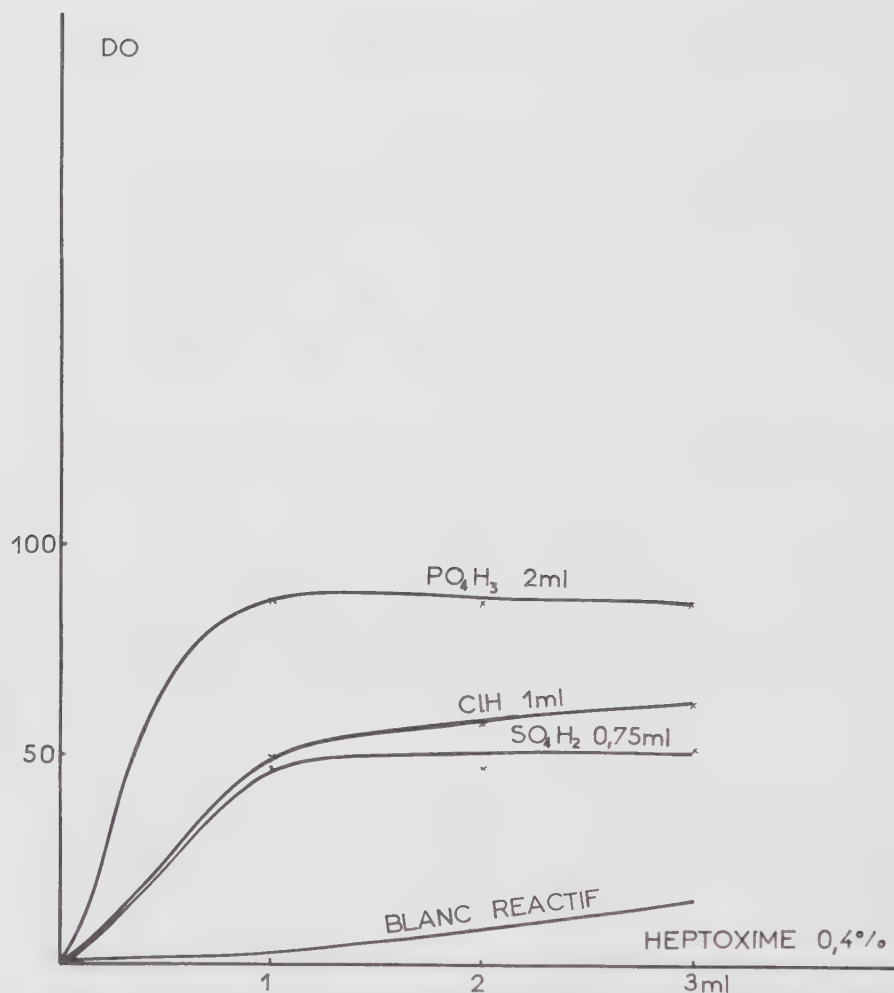
Les colorations sont d'intensité voisine avec 1 et 2 ml d'acide sulfurique à 50 %. L'addition d' AsO_4H_3 a un effet intensifiant en présence de 2 ml d'acide sulfurique dilué et 1 ml d' AsO_4H_3 à 100 % est la quantité la plus favorable, quantité nettement supérieure à celle introduite avec le réactif arsénicosulfurique habituel.

Nous préconisons donc l'emploi d'un réactif arsénicosulfurique plus riche en AsO_4H_3 (25 g pour 100 ml d'acide sulfurique à 50 %) et l'introduction d'une quantité de 3,5 à 4 ml de ce réactif (appelé réactif arsénicosulfurique concentré) pour 6 ml de volume total.

II - CONCENTRATION EN HEPTOXIME

Nous utilisons une solution à 0,4 % (environ M/40). En introduisant des quantités croissantes de cette solution dans un milieu réactionnel sulfurique, phosphorique ou arsénicosulfurique, l'intensité de la réaction colorée augmente régulièrement jusqu'à 1 ml (graphique 38). Par contre en milieu chlorhydrique les colorations gagnent légèrement en intensité en passant à 2 puis 3 ml de solution d'heptoxime.

La quantité de 1 ml d'heptoxime en solution à 0.4 % est donc la plus favorable (une quantité supérieure est à déconseiller, vu l'augmentation du blanc réactif).



Graphique 38. Réaction urée-heptoxime
Intensité en raison de la quantité d'heptoxime en milieu
chlorhydrique, sulfurique et phosphorique

Nous remarquons donc que pour 200 μg d'urée (1 ml d'urée M/300), il faut environ 4 mg d'heptoxime (1 ml solution M/40). Comme avec la réaction urée-diacétyle ou ses oximes, il faut un excès de réactif dicétonique mais les proportions relatives de dérivé carbamidé et de dicétone ne sont plus que de 1 pour 10 au lieu de 1 % avec le diacétyle et ses oximes.

III - SUBSTANCES INTERFERENTES

Le chlorate ajouté avant le chauffage en milieu chlorhydrique (0,5 ml M/100 et M/1000) est inhibiteur alors que la chloramine ajoutée après le chauffage est pratiquement inactive (légère action intensifiante avec 1 ml de chloramine M/100).

Les solvants interfèrent également dans la réaction urée-heptoxime et les solvants cétoniques donnent une coloration parasite avec l'heptoxime.

IV - PHOTOSTABILITE ET PHOTSENSIBILITE

Dans les conditions opératoires précédemment définies nous avons constaté que la lumière n'intervenait pas dans le développement des réactions. Les colorations obtenues par chauffage dans un bain-marie placé à la lumière sont de même intensité que celles développées à l'obscurité.

De même après développement des colorations, la lumière est sans effet comme le montre le tableau suivant, où intentionnellement à titre de comparaison nous avons également fait figurer la diacétylmonoxime.

Tableau 51 : Photostabilité de la réaction urée-heptoxime. Comparaison avec la diacétylmonoxime

R.A. concentré ml	Diacétylmonoxime		Heptoxime	
	2	4	2	4
1ère lecture	0,56	0,24	0,33	0,52
2ème lecture après 30 mn d'exposition à la lumière exté- rieure du jour	0,39	0,13	0,34	0,51
3ème lecture après 70 mn d'exposition à la lumière exté- rieure du jour	0,28	0,10	0,41	0,52

Pour tenir compte de la différence de sensibilité des réactions colorées urée-diacétylmonoxime et urée-heptoxime, les colorations ont été obtenues respectivement avec 48 et 240 μg d'urée. Le temps de chauffage était de 30 minutes. Nous remarquons qu'avec l'heptoxime et 4 ml de réactif arsénicosulfurique, les colorations sont parfaitement stables à la lumière alors qu'elles sont nettement abaissées avec la diacétylmonoxime. Nous pouvons noter à cette occasion qu'une grande acidité est aussi un facteur de stabilité car la réaction est incomplètement développée avec 2 ml de réactif arsénicosulfurique (ce que nous avons déjà remarqué dans la Première Partie de ce Travail, page 130).

Cette excellente photostabilité est donc la qualité majeure de cette réaction colorée.

CONCLUSION

Nous pouvons retenir les caractères suivants :

- développement lent de la réaction urée-heptoxime
- l'acide phosphorique donne la réaction la plus intense. Les acides sulfurique, chlorhydrique et perchlorique peuvent convenir. Par contre les autres acides donnent de faibles colorations.

L'utilisation d'un réactif arsénicosulfurique permet d'accélérer le développement de la réaction colorée mais la cinétique reste encore lente. Nous avons retenu 4 ml d'un réactif arsénicosulfurique contenant 25 g d' AsO_4H_3 pour 100 ml de SO_4H_2 dilué au demi :

- nécessité d'un excès d'heptoxime (10 molécules pour 1 molécule d'urée). Cette quantité est introduite par 1 ml de la solution à 0,4 %.
- bonne photostabilité. La photostabilité est donc pratiquement la seule qualité justifiant l'emploi de l'heptoxime.

CHAPITRE DEUXIEME

ETUDE DE LA REACTION UREE-CYCLOHEXANEDIONE

Des essais rapides mettant en présence la cyclohexane-1-2 dione (CHD), l'urée et différents acides, ont fait apparaître à température ordinaire :

- une coloration violette en présence de PO_4H_3 - HCl et SO_4H_2 dilué
- une coloration jaune virant au rose avec fluorescence verte en présence du réactif arsénicosulfurique.

Les colorations violettes passent lentement au bleu, au vert et enfin au jaune après plusieurs jours.

La sensibilité de la réaction urée-CHD est faible.

Conditions expérimentales utilisées pour cette étude

- Urée prise d'essai voisine de 1 mg
- Cyclohexanedione M/10 ou M/20 n ml
- Acide n ml
- Eau distillée q.s.p. 6 ml

Bain-marie 37°

Lecture de la coloration violette à 575 nm.

I - INFLUENCE DES ACIDES

Les acides sont nécessaires à la formation du complexe coloré urée-CHD.

HCl , SO_4H_2 , PO_4H_3 et NO_3H permettent le développement d'une coloration violette à température ordinaire. CH_3COOH et AsO_4H_3 ne le permettent pas. Un excès de SO_4H_2 ou de NO_3H provoque la formation d'une coloration jaune avec la CHD elle-même.

La réaction colorée la plus intense est obtenue en milieu chlorhydrique alors que le milieu nitrique est le moins favorable. Les quantités d'acides donnant la réaction la plus intense sont 3 ml pour PO_4H_3 , 1,5 ml pour SO_4H_2 , 2,5 ml pour HCl . Nous avons retenu PO_4H_3 parce que de manipulation plus aisée.

L'addition d' AsO_4H_3 ou ClO_4H à SO_4H_2 provoque l'apparition d'une fluorescence verte intense.

II - CONCENTRATION EN CYCLOHEXANEDIONE

La CHD (PM = 112) est un produit pâteux partiellement cristallisé à forte odeur de réglisse. Il devient de plus en plus visqueux avec le temps même en le conservant à 0° en flacon brun paraffiné.

Les problèmes posés par la CHD-réactif ont pour origine l'insolubilité et l'instabilité de la dicétone.

Cette dicétone est difficile à dissoudre dans l'eau. Même après longue agitation, les solutions M/ 10, M/ 20 ou M/ 50 restent troubles et tout au long des manipulations, le produit adhère aux parois du verre. La préparation de solutions aqueuses est donc difficile. Par contre, CHD se dissout bien dans les solvants organiques mais ceux-ci interfèrent dans la réaction colorée.

La conservation de CHD cristallisée ou en solution est assez limitée. La limite d'utilisation des solutions aqueuses ou méthyliques est de huit jours.

Dans la recherche d'un protocole expérimental, nous avons trouvé que, en milieu phosphorique, et après 60 minutes de bain-marie à 37°, la quantité la plus favorable de CHD pour 0,5 mg d'urée est apportée par 1 ml de solution M/ 10.

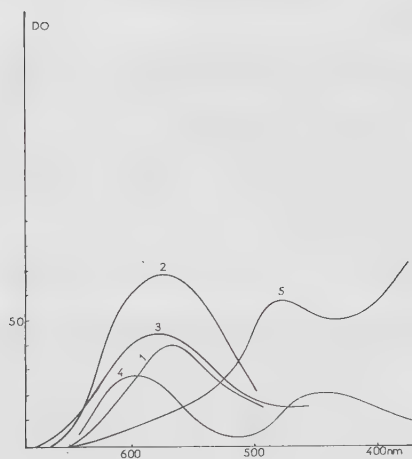
III - EVOLUTION DE LA REACTION UREE-CYCLOHEXANEDIONE

1) Influence des acides

Dans les conditions décrites précédemment, nous avons suivi parallèlement les colorations en milieu sulfurique, arsénicosulfurique et phosphorique. Voici l'évolution des colorations visibles à l'œil nu :

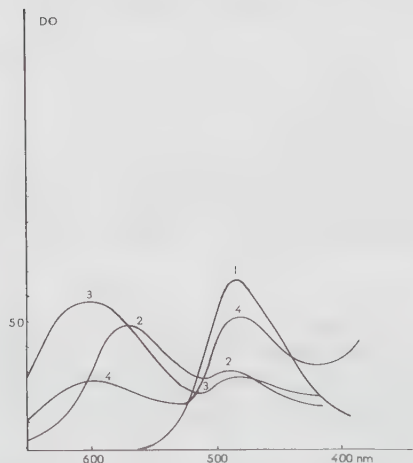
Tableau 52 : Evolution de la réaction urée-cyclohexanedione en milieu phosphorique, sulfurique et arsénicosulfurique

	PO ₄ H ₃ (3 ml)	SO ₄ H ₂ (1,5 ml)	R.A. (3 ml)
Après 10 mn	incolore	incolore	jaune + fluorescence verte
Après 60 mn	violet	incolore	jaune + fluorescence verte
Après 4 h	violet	violet pâle	rose + fluorescence verte
Après 7 h	bleu violet	violet	rose violet + fluorescence verte
Après 24 h	bleu	bleu violet	vert bleu + fluorescence verte
Après 36 h	bleu	bleu	vert bleu + fluorescence verte
Après 48 h	bleu vert	bleu vert	vert jaune + fluorescence verte
Après 4 jours	vert clair	vert bleuté	vert jaune + fluorescence verte
Après 8 jours	jaune	jaune	jaune fluorescent



Graphique 39. Spectres d'absorption de la réaction urée-cyclohexanedione en milieu phosphorique

- 1 - Coloration violet-parme (après 60 mn)
- 2 - Coloration violette (après 4 heures)
- 3 - Coloration bleue (après 24 heures)
- 4 - Coloration verte (après 3 jours)
- 5 - Coloration jaune (après 8 jours)



Graphique 40. Spectres d'absorption de la réaction urée-cyclohexanedione en milieu arsénicosulfurique

- 1 - Coloration jaune (après 60 mn)
- 2 - Coloration rose (après 4 heures)
- 3 - Coloration verte (après 2 jours)
- 4 - Coloration jaune (après 8 jours)

En milieu phosphorique et sulfurique, la coloration passe donc du violet rouge au violet, au bleu puis au vert enfin au jaune. Les spectres de ces colorations (graphique 39) mettent en évidence la formation d'un premier pic qui progresse de 565 à 600 nm, puis l'apparition d'un pic secondaire à 460-480 nm qui remplace le premier.

Le développement de la réaction colorée est plus lent en milieu sulfurique.

En milieu arsénicosulfurique il y a en plus apparition au début, d'une coloration jaune. Le graphique 40 montre un pic net avec un maximum à 485 nm. Ce pic est ensuite remplacé par celui correspondant à la coloration violette, observée en milieu phosphorique, la superposition du violet et du jaune donnant la teinte rose observée. L'acide arsénique est responsable de ce phénomène.

En résumé, les colorations obtenues évoluent avec le temps.

2) Influence de la concentration en cyclohexanedione

La réaction colorée se développe plus rapidement lorsque la concentration en CHD est plus élevée.

3) Effet de la température

A $+4^{\circ}$ pour 0,5 mg d'urée, la première coloration perceptible apparaît après 3 heures. A 37° après 5 minutes. Au dessus de 60° - 70° il n'apparaît plus de coloration violette : il se forme un complexe jaune fluorescent en particulier après chauffage au bain-marie bouillant.

Dans le tableau suivant nous présentons les résultats obtenus à 37° , 45° et 50° .

Tableau 53 : Evolution de la coloration en fonction de la température et du temps de chauffage

Température	Temps de chauffage	D.O.
37°	30 mn	1,52
	60 mn	1,59
45°	30 mn	1,33
	60 mn	1,01
50°	30 mn	1,02
	60 mn	0,74

Nous pouvons remarquer que les colorations se développent plus rapidement à 45° et 50° qu'à 37° mais elles sont moins intenses.

Dans nos expériences ultérieures nous mesurerons l'intensité de la coloration violette obtenue après 60 minutes à 37° ou 30 minutes à 45°, elle est suffisamment stable pour une lecture photométrique. Nous avons tenté sans succès, par addition de différents composés (solvants, oxydants, etc ...) de bloquer la coloration au stade du complexe violet.

IV - INFLUENCE DES SOLVANTS ORGANIQUES

Les solvants organiques interfèrent dans la réaction urée-CHD (tableau).

Tableau 54 : Intensité de la réaction colorée urée-cyclohexanedione en présence de solvants (0,1 ml)

Témoin sans solvant	1,71	Ethylèneglycol	1,25
Méthanol	1,35	Acétone	1,38
Ethanol	1,30	Dioxane	0
Propanol	1,25	Méthylal	0
Butanol	0,85	Ethyméthylcétone	1,15
Alcool amylique	1,45		

Tous ces composés sont plus ou moins inhibiteurs, le dioxane et le méthylal l'étant même totalement. Il faut remarquer l'effet inhibiteur de l'acétone, composé trouvé intensifiant dans les réactions colorées déjà étudiées précédemment.

CONCLUSION

La nouvelle réaction colorée urée-cyclohexanedione que nous avons mise en évidence se caractérise par :

- sa formation en milieu acide
- son développement rapide entre 30 et 50°
- sa sensibilité relativement faible (200 à 500 μ g d'urée dans la prise d'essai)
- son évolution du violet au bleu puis au vert et au jaune

Les oxydants provoquent, en plus une fluorescence verte.

En vue d'une application quantitative, nous avons retenu, comme acide, l'acide phosphorique (3 ml pour 6 ml de volume final) une concentration de cyclohexanedione égale à 1 ml de solution M/ 10 et un temps de chauffage de 60 minutes à 37° .

Par rapport à l'heptoxime et aux alpha-dicétones, le seul intérêt de cette réaction colorée est son développement à température inférieure à 100°. Mais l'instabilité de la dicétone et sa solubilité difficile sont des inconvénients certains.

CHAPITRE TROISIEME

ETUDE DE LA REACTION UREE-NIOXIME

La cyclohexanedionedioxime ou nioxime (PM = 142) a été essayée par analogie à l'utilisation de la monoxime ou de la dioxime du diacétyle, pour remédier à l'instabilité de la cyclohexanedione.

Des essais préliminaires ont montré que la nioxime donnait une réaction colorée très voisine de celle obtenue avec la cyclohexanedione. La 4-méthyl-nioxime donne également une réaction colorée mais elle est nettement moins intense. Nous n'utiliserons donc pas ce dernier composé.

Conditions expérimentales pour l'étude de la réaction urée-nioxime

- Urée prise d'essai contenant 200 à 1000 μg
- Solution de nioxime M/25 n ml
- Acide n ml
- Eau distillée q.s.p. 6 ml

Bain-marie 37° ou 45°

Lecture de la coloration violette à 575 nm

Comme avec la cyclohexanedione, les colorations d'abord violettes évoluent ensuite vers le bleu, le vert et le jaune. Les spectres d'absorption sont identiques à ceux présentés dans le graphique 39.

I - INFLUENCE DES ACIDES

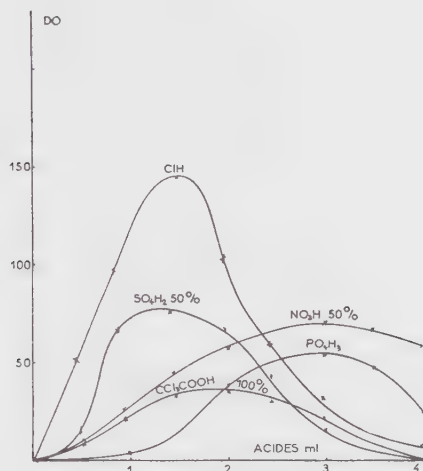
Les acides sulfurique, phosphorique, chlorhydrique, nitrique, trichloracétique et perchlorique conviennent au développement d'une coloration violette à 37°. Avec les acides sulfosalicylique et paratoluènesulfonique, il se forme un complexe jaune fluorescent. L'acide arsénique ne permet pas le développement d'une réaction colorée.

Nous avons précisé l'influence de la concentration en acide sur l'intensité des colorations.

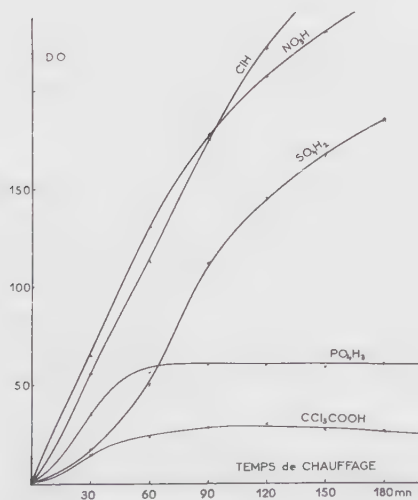
Dans le graphique 41, nous avons représenté les résultats obtenus avec 1 mg d'urée, 1 ml de nioxime M/25, des quantités variables d'acides dans un volume total de 6 ml (bain-marie 37° : 60 minutes).

Les concentrations les plus favorables sont :

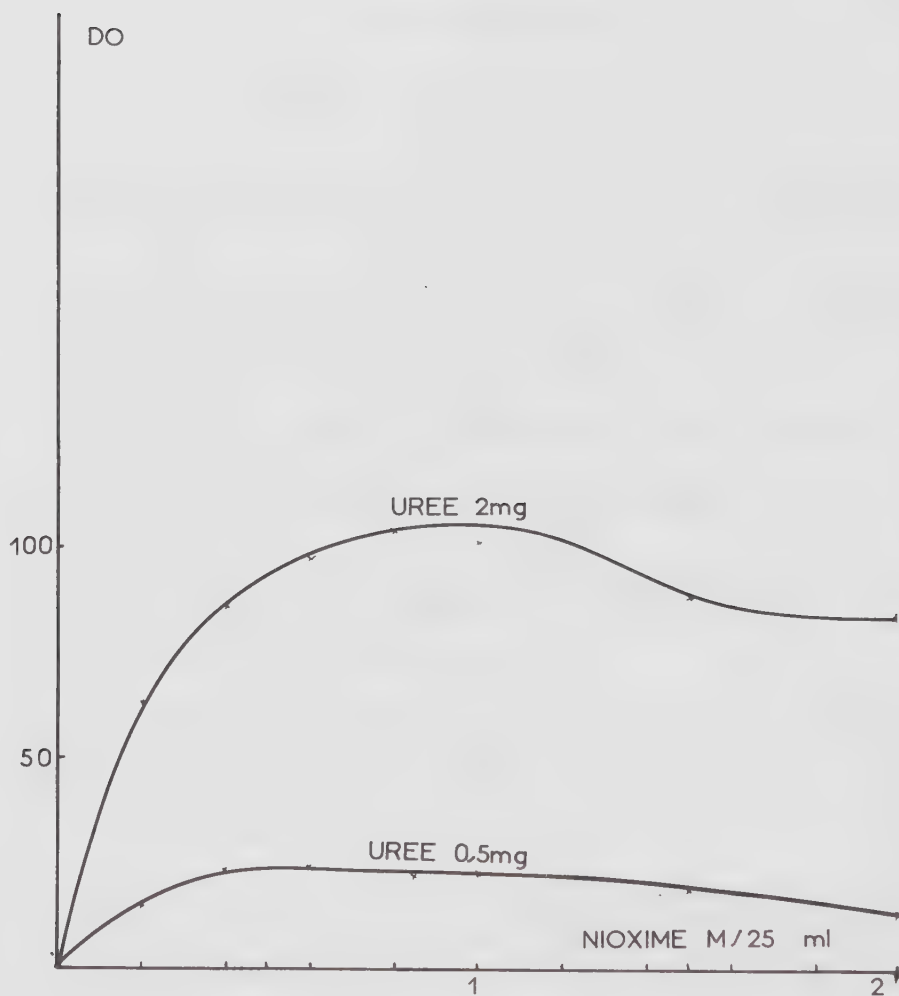
- 1,5 ml d'acide chlorhydrique
- 1 à 1,5 ml d'acide sulfurique dilué au demi



Graphique 41. Réaction urée-nioxime
Intensité en fonction de la quantité de réactif acide



Graphique 42. Réaction urée-nioxime
Cinétique en milieu chlorhydrique, sulfurique, nitrique,
trichloracétique et phosphorique



Graphique 43. Réaction urée-nioxime
Intensité en fonction de la quantité de nioxime

- 3 ml d'acide nitrique dilué au demi
- 3 ml d'acide phosphorique
- 2 ml d'acide trichloracétique (solution à 100 % p/v)

Avec ces quantités d'acides nous avons précisé la cinétique de la réaction urée-nioxime (graphique 42). En milieu chlorhydrique, nitrique et sulfurique, il se développe une réaction colorée intense qui progresse encore après 180 minutes de bain-marie à 37°.

Nous avons adopté l'acide phosphorique pour sa manipulation plus aisée et parce qu'il donne une coloration violette entièrement développée après 60 minutes de chauffages à 37°. Mais nous tenterons d'améliorer la cinétique en milieu chlorhydrique.

L'addition d'acide arsénique au milieu sulfurique provoque la formation au début d'une coloration jaune qui évolue vers le violet et d'une fluorescence verte qui persiste. Ce phénomène est identique à celui observé avec la cyclohexanedione.

II - REACTIF DICETONIQUE

La nioxime est un composé bien cristallisé, stable, suffisamment soluble dans l'eau (8,2 g pour 1000 à 20°) donc d'utilisation plus facile que la cyclohexanedione. Nous avons préparé une solution aqueuse M/25.

Le graphique 43 met en évidence les relations entre l'intensité des colorations et la quantité de nioxime. Si, pour 0,5 mg d'urée, 0,5 ml de solution M/25 de nioxime est suffisant, pour 2 mg d'urée il est nécessaire d'utiliser une plus grande quantité de dioxime pour avoir la coloration la plus intense.

Nous avons donc retenu 1 ml de nioxime M/25 pour le dosage de l'urée en milieu phosphorique. Cette quantité de nioxime permet de doser de 0,25 à 3 mg d'urée dans la prise d'essai.

Nous pouvons remarquer qu'avec la nioxime il n'est pas nécessaire d'introduire un grand excès de dicétone par rapport à l'urée. Les proportions d'urée et de nioxime sont toujours voisines (1 ml d'urée M/50 pour 1 ml de nioxime M/25).

III - ESSAIS AVEC DIFFERENTES SUBSTANCES SUSCEPTIBLES D'INTERFERER DANS LA REACTION

Il était intéressant de comparer les effets des substances oxydantes, intensifiantes, des sels métalliques et des solvants à ceux observés dans les réactions colorées connues décrites dans la Première Partie de ce Travail.

1) Composés oxydants et réducteurs

Nous avons étudié les composés suivants : acide arsénique, chlorate, persulfate, nitrate, arséniate de sodium, chloramine ajoutés avant le chauffage (1 ml de solution M/ 10, M/ 100 et M/ 1000) en milieu phosphorique, sulfurique et chlorhydrique.

Le nitrate et l'arséniate sont sans effet sur l'intensité ou la cinétique de la réaction. La chloramine en solution M/ 10 précipite dans le milieu et inhibe complètement la formation de la coloration. A concentration inférieure elle est sans effet.

Le chlorate et le persulfate sont les composés les plus actifs : en solution M/ 10 ils sont totalement inhibiteurs en milieu sulfurique alors qu'en milieu phosphorique ils provoquent la formation de complexes jaunes fluorescents. En solution M/ 100 nous avons observé dans les deux milieux acides des colorations jaunes fluorescentes. Enfin en solution M/ 1000, le chlorate inactif en milieu phosphorique garde en milieu sulfurique le pouvoir de faire apparaître une fluorescence verte et il intensifie nettement la coloration violette ; le persulfate a la même activité en milieu sulfurique mais contrairement au chlorate il donne encore un complexe jaune fluorescent avec l'acide phosphorique.

L'acide arsénique a le même effet que le chlorate, mais il agit à concentration beaucoup plus élevée : inactif en solutions M/ 1000 et M/ 100 il donne en solution M/ 10 en milieu sulfurique, une coloration plus intense puis à concentration supérieure apparaît la fluorescence puis la coloration jaune.

Nous avons précisé l'influence du chlorate en milieu chlorhydrique (500 μ g d'urée, 1,5 ml HCl et 1 ml de nioxime M/ 25 pour 6 ml de volume total).

Tableau 55 : Intensité de la réaction urée-nioxime développée en milieu chlorhydrique en présence de chlorate

Chlorate M/ 1000 ml	0	0,01	0,05	0,1	0,2	0,5	1
BM 37° - 60 mn	0,39	0,43	0,55	0,62	0,67	0,87	0,89
BM 37° - 120 mn	1,00	1,02	1,10	1,17	1,20	1,40	1,50

L'intensification par le chlorate est donc très nette mais la cinétique de la réaction colorée n'est que partiellement améliorée puisqu'elle progresse encore nettement même avec 1 ml de chlorate : intensification de 68 % (au lieu de 155 % en l'absence de ce composé.

De même nous avons voulu étudier l'effet de la chloramine ajoutée après le chauffage. En milieu phosphorique, la chloramine est sans effet sauf à concentration supérieure à 0,5 ml M/1000 où nous avons observé une inhibition. En milieu chlorhydrique au contraire, la chloramine est capable d'intensifier légèrement la coloration (50 % avec 1 ml de solution M/1000).

Suite à ces essais, il faut remarquer que les réactions colorées développées en milieu phosphorique sont nettement moins sensibles à l'action des substances oxydantes que les milieux sulfurique et chlorhydrique. Avec ces acides les oxydants provoquent d'abord une intensification, puis la formation d'une fluorescence verte, enfin une coloration jaune.

Comme substances réductrices nous avons étudié l'effet du nitrite et du sulfite de sodium. Il y a inhibition avec les solutions M/10 et M/100.

2) Sels métalliques

Nous avons d'abord vérifié que les anions monovalents (chlorure, acétate), bivalents (sulfate, carbonate, oxalate) ou trivalents (phosphate, citrate) et les cations monovalents (sodium, potassium, ammonium) ou bivalents (magnésium, calcium) n'interfèrent pas dans la réaction colorée (1 ml de solution M/10, M/100 et M/1000). De même les ions fluorure, chlorure, bromure, iodure n'interfèrent pas (à l'exception de certains essais où, comme avec la diacétylmonoxime, les iodures donnaient des réactions colorées plus intenses).

Les sels de nickel, zinc et cadmium sont sans effet.

Le manganèse (sulfate) en solution M/10 et en milieu sulfurique est capable d'intensifier la coloration.

Le cuivre en solution M/10 est totalement inhibiteur. En solution M/100, il provoque l'apparition d'une fluorescence verte en milieu sulfurique et chlorhydrique, et reste inhibiteur en milieu phosphorique.

Le Fe^{+++} est inhibiteur aussi à forte concentration. Il provoque en milieu phosphorique, l'apparition d'une fluorescence verte dans une coloration jaune.

3) Solvants organiques

Dans le tableau ci-dessous sont présentés les résultats obtenus après addition de 0,5 ml de solvants.

Tableau 56 : Intensités de la réaction urée-nioxime développée en milieu phosphorique en présence de solvants organiques

Témoin	Méthanol	Ethanol	Butanol	Ethylè - neglycol	Acétone	Méthylal	Dioxane
0,83	0,57	0,54	0,46	0,48	1,87	0	0

Les alcools sont partiellement inhibiteurs, le dioxane et le méthylal le sont entièrement. Mais l'acétone intensifie très nettement la réaction urée-nioxime, contrairement à ce que nous avons observé avec la cyclohexanedione.

Nous avons étudié plus en détail cet effet particulièrement intéressant de l'acétone.

Tableau 57 : Intensité de la réaction urée-nioxime en présence d'acétone

	Milieu phosphorique					Milieu chlorhydrique				
Acétone ml	0	0,1	0,2	0,5	1	0	0,1	0,2	0,5	1
BM 37° - 40 mn	0,31	0,70	0,72	0,62	0,29					
- 60 mn	0,52	1,15	1,25	1,08	0,73	0,73	0,83	0,85	0,73	0,32
- 120 mn						1,60	1,87	1,92	1,75	1,23

La quantité d'acétone donnant la coloration la plus intense dans les deux milieux acides est 0,2 ml. Mais ce solvant est nettement moins actif en milieu chlorhydrique et se montre même inhibiteur à forte concentration. Nous avons vérifié en milieu phosphorique, l'effet de la quantité optima d'acétone sur le développement de la réaction urée-nioxime (graphique 44) : l'acétone ne modifie pas la cinétique de la réaction qui n'est donc que nettement intensifiée. Cette propriété est intéressante parce qu'elle sensibilise la réaction colorée développée en milieu phosphorique.

4) Divers adjuvants

Nous avons étudié en milieu phosphorique et chlorhydrique l'interférence de diverses substances actives sur les réactions colorées avec les alpha-dicétones aliphatiques (phénazone, thiosemicarbazide, diphenylaminosulfonate, tryptophane et glucuronolactone) sur la réaction colorée urée-nioxime développée à 37°.

Thiosemicarbazide

L'addition de quantités de thiosemicarbazide échelonnées entre 1 ml de solution M/1000 et 1 ml de solution M/200, se traduit par une inhibition croissante du développement de la réaction en milieu phosphorique et chlorhydrique.

Phénazone

Ce composé interfère dans la réaction à partir de l'introduction de 0,1 ml de solution M/10. Les colorations obtenues sont bleues, et elles évoluent vers le vert. Elles sont toujours d'intensité plus faible que celle du témoin.

Diphénylaminosulfonate

Effet inhibiteur dès 1 ml de solution M/2000. Cet effet croît avec la dose utilisée.

Tryptophane

Inhibition à partir de 1 ml de solution M/2000.

Glucuronolactone

Ce composé introduit en solution M/10 (0,1 à 1 ml) ne modifie ni l'intensité ni la cinétique de la réaction.

En résumé, ces composés essayés interfèrent dans la réaction urée-nioxi-me. Mais contrairement à ce que nous avons observé avec les alpha-dicétones ils ont en général un effet inhibiteur.

IV - REACTIONS COLOREES DEVELOPPEES A 100°

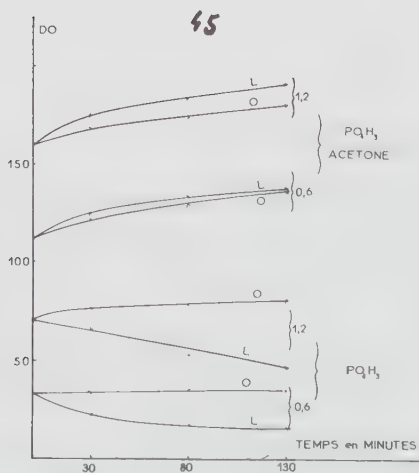
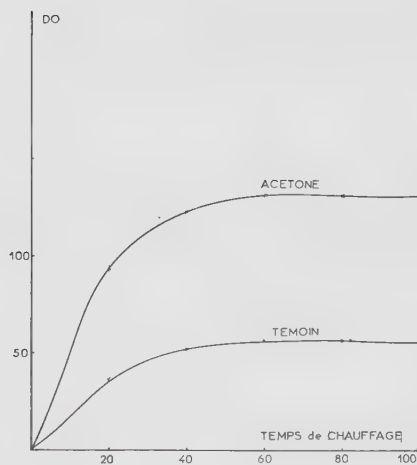
Les réactions en milieu phosphorique développées au bain-marie bouillant donnent des colorations jaunes fluorescentes. Après refroidissement on observe des anneaux colorés violets. Si on agite ces tubes, la teinte se répartit dans la solution puis vire au bleu.

Le chauffage à 100° permet aussi d'obtenir des colorations violettes dans les milieux sulfosalicylique et paratoluènesulfonique alors qu'à 37°, il ne se forme que des colorations jaunes fluorescentes.

En présence d'acide perchlorique (0,4 ml d'une solution à 10 %) apparaît une coloration bleue qui n'évolue pas.

V - PHOTSENSIBILITE ET PHOTOSTABILITE DES COLORATIONS

Nous avons vérifié que la lumière artificielle ou la lumière normale du jour dans un laboratoire n'interfèrent pas dans le développement des colorations.



Mais ces colorations ne sont pas stables à la lumière vive (graphique 45). En milieu phosphorique il y a une nette diminution des réactions colorées. En présence d'acétone, la coloration au contraire, s'intensifie légèrement.

Nous n'avons donc pas retrouvé dans la nioxime la qualité de l'heptoxime. Cependant il ne faut pas oublier que ces colorations se développent lentement à 37° et que la durée d'exposition est donc plus longue. En comparant la photostabilité des réactions urée-nioxime à celle de réactions urée-diacétylmonoxime développées dans les mêmes conditions de température et d'acidité nous avons trouvé un meilleur comportement pour la nioxime (affaiblissement de 60 % avec la diacétylmonoxime et de 20 % avec la nioxime après 30 minutes d'exposition à la lumière).

CONCLUSION

La nioxime est un nouveau réactif des dérivés carbamidés. Elle fournit des colorations variables suivant les conditions opératoires :

- violettes à température inférieure à 50° en milieu phosphorique, sulfurique, trichloracétique, perchlorique, nitrique, chlorhydrique. Ces colorations évoluent lentement vers le bleu, le vert et le jaune
- bleues en présence de phénazone (0,1 à 0,5 ml M/10) et en milieu perchlorique après chauffage à 100°
- jaunes fluorescentes en milieu sulfosalicylique ou paratoluènesulfonique à 37° et en présence d'une grande quantité d'oxydant ou de sel métallique
- jaunes puis roses et violettes en milieu arsénicosulfurique avec fluorescence verte.

La réaction colorée violette nous a semblé la plus intéressante. Elle est voisine de celle obtenue avec la cyclohexanedione :

- sensibilité faible : 200 à 500 μg d'urée dans la prise d'essai
- développement à température inférieure à 50°.

En ce qui concerne le choix de l'acide, nous donnons notre préférence à PO_4H_3 . Quoique ne permettant pas la formation de la coloration la plus intense, nous avons retenu PO_4H_3 (3 ml) parce qu'avec cet acide la réaction est développée en 60 minutes à 37° ou en 30 minutes à 45°.

Un grand excès de réactif dicétonique n'est pas nécessaire avec la nioxime, la réaction se développant même avec des proportions équimoléculaires de nioxime et d'urée.

Nous avons mis en évidence l'effet des substances oxydantes ou des sels métalliques qui modifient la réaction colorée et surtout font apparaître une intense fluorescence verte.

L'acétone intensifie très nettement la réaction. C'est une différence importante avec la cyclohexanedione où l'acétone était inhibitrice.

Enfin contrairement à ce que nous avons observé avec les alpha-dicétones, différentes substances comme le thiosemicarbazide, la phénazone ou le tryptophane n'ont qu'un effet inhibiteur. Cette réaction colorée semble donc beaucoup moins sensible à l'action de différentes substances interférentes.

Le développement rapide d'une coloration à température basse reste donc le caractère le plus intéressant de la réaction urée-nioxime.

En vue de son utilisation pratique nous proposons donc le protocole opératoire suivant :

- Urée 0,2 à 3 mg
- PO_4H_3 3 ml
- Nioxime M/25 1 ml
- Eau distillée q.s.p. 6 ml

Bain-marie 37° 60 minutes (ou 45° 30 minutes)

CONCLUSIONS DE LA DEUXIEME PARTIE

Nous avons mis en évidence de nouvelles réactions colorées entre des alpha-dicétones cyclaniques et l'urée. Les caractères des colorations obtenues avec l'heptoxime et la nioxime diffèrent très nettement :

- l'heptoxime donne avec l'urée une coloration jaune se développant lentement à 100°

- la cyclohexanedione et sa dioxime réagissent avec l'urée à 37° pour former des colorations violettes évoluant lentement vers le bleu puis le vert.

La sensibilité de ces réactions colorées est inférieure à celles obtenues avec les alpha-dicétones aliphatiques : alors qu'en général 20 μ g d'urée donnent une coloration avec le diacétyl et ses oximes, il faut 50 à 100 μ g d'urée avec l'heptoxime et 200 μ g avec la nioxime. Les différents composés trouvés interfèrent avec le diacétyl sont nettement moins actifs. Seule l'acétone intensifie la réaction urée-nioxime (mais non la réaction urée-cyclohexanedione).

Le développement de ces colorations se fait également en milieu acide. NO_3H est utilisable avec la nioxime et les acides sulfosalicylique et paratoluène-sulfonique développent des colorations jaunes au lieu de violettes avec les autres acides. Le rôle de l'acide est donc très important aussi avec les dicétones cyclaniques.

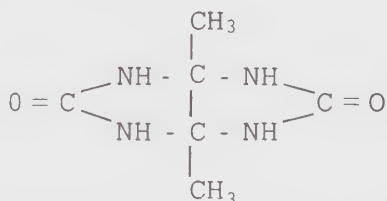
La cyclohexanedione étant instable (comme les alpha-dicétones aliphatiques) nous retiendrons l'heptoxime et la nioxime en vue d'applications biologiques (Quatrième Partie de ce Travail).

TROISIEME PARTIE

HYPOTHESES SUR LA NATURE DES COMPLEXES COLORES

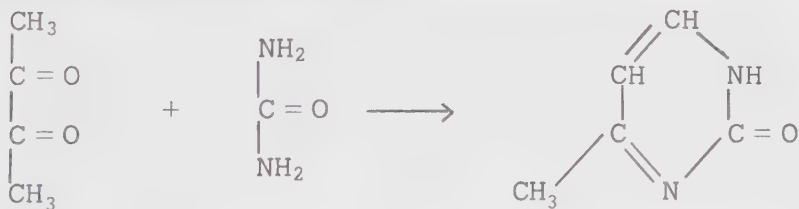
La nature des complexes colorés formés entre les dérivés carbamidés et les alpha-dicétones est inconnue. Plusieurs hypothèses ont été présentées ou semblent possibles.

1 - Dans des conditions différentes de celles retenues pour ces réactions colorées, FRANCHIMONT et KLOBBIE (1888) et BILTZ (1907) ont obtenu des diuréines par condensation de deux molécules de dérivé carbamidé avec une molécule dicétonique.

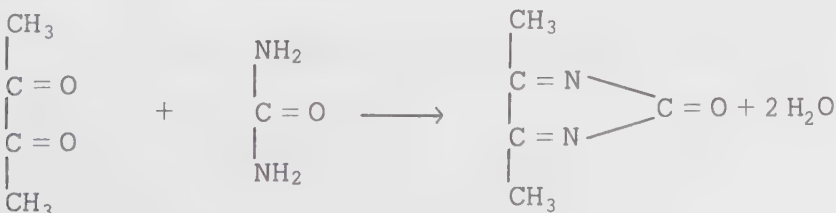


L'addition d'acide nitrique à cette diuréine donne naissance à des dérivés nitrés jaunes.

2 - FEARON (1939) suggéra que les pigments obtenus dans la réaction colorée dérivait d'un cycle pyrimidique, la fermeture de ce cycle étant provoquée par une "condensation oxydative" utilisant un méthyle du diacétyle.



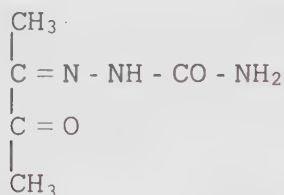
3 - Un composé résultant de la condensation des deux fonctions aminées avec les deux fonctions cétones a été isolé par PECHMAN (1888), DICKEN-MANN et coll. (1954) ont présenté une hypothèse dans ce sens pour la réaction colorée :



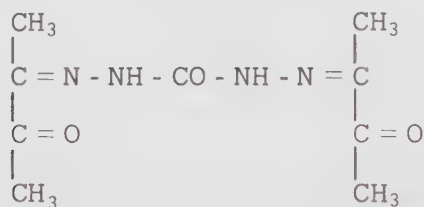
De même PIEN et coll. (1936-1937) ont envisagé une telle réaction entre le diacétyl et des diamines.

4 - BEALE et CROFT (1961) ont proposé trois formules faisant entrer non pas le diacétyl mais sa monoxime dans le complexe coloré :

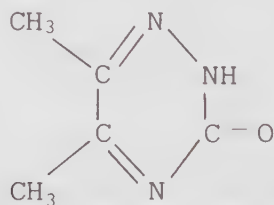
a) condensation d'une molécule d'urée et d'une molécule de diacétylmonoxime



b) condensation de deux molécules de diacétylmonoxime et d'une molécule d'urée

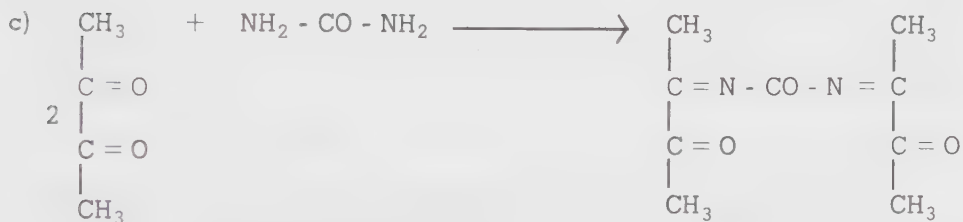
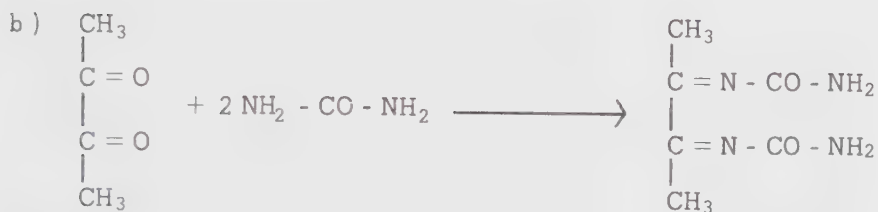
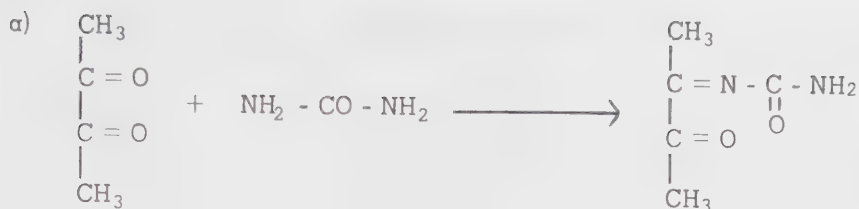


c) condensation entre une molécule d'urée et une molécule de diacétylmonoxime avec formation d'un cycle triazinique



5 - PERROT et VELAY (1958) sans donner de précisions affirment que deux molécules d'urée se combinent à une molécule de phénylpropanedionemonoxime.

6 - Enfin les formules suivantes semblent possibles :



Nous avons tenté d'apporter des arguments pour ou contre certaines hypothèses présentées :

- . en étudiant les dicétones qui sont capables de réagir (Chapitre Premier)
- . en comparant la réactivité des dérivés carbamidés (Chapitre Deuxième)
- . en utilisant la méthode des variations continues de Job (Chapitre Troisième).

CHAPITRE PREMIER

ETUDE DES DICETONES

I - DICETONES DONNANT UNE REACTION POSITIVE OU NEGATIVE

En plus des alpha-dicétones aliphatiques étudiées dans la Première Partie de ce Travail (diacétyl, phénylpropanedione) et des alpha-dicétones cyclaniques décrites dans la Deuxième Partie (cyclohexane 1-2 dione et son dérivé 4 méthylé, cycloheptanedione), nous avons trouvé dans la littérature la description d'une réaction colorée entre l'urée et l' α' isonitrosométhylisobutylcétone par VELAY (1957). KULHANEK et coll. (1963) semblent avoir obtenu des réactions positives avec l'acétylbutyroyle, l'acétylpiopionyle et leurs oximes. Enfin il est possible de rapprocher des réactions colorées des dérivés carbamidés, les réactions de PIEN et coll. (1936-1937) entre des alpha-dicétones et des diamines aromatiques. Ces auteurs en plus du diacétyl avaient noté une réaction positive avec le méthylglyoxal. Avec l'urée nous avons également obtenu une réaction positive avec le méthylglyoxal.

Nous avons rassemblé ces dicétones dans le tableau ci-après (page 169).

Les dicétones suivantes sont incapables de réagir avec les dérivés carbamidés en milieu acide : (tableau page 169) benzile, benzoïne, isonitrosoacétylacétone (VELAY 1957), furile, glyoxal (NATELSON et coll. 1951). Nous avons vérifié la non réactivité de la furildioxime, de la benzildioxime et du glyoxal. Parmi les dicétones cyclaniques nous n'avons pas obtenu de réaction positive avec le dimédon (diméthylcyclohexane 1-3-dione) et la 3-bromocyclopentane-1-2-dione*.

Dans ce groupe on trouve donc des alpha-dicétones n'ayant pas de groupement méthyle terminal (benzile, glyoxal, furile) et des bêta-dicétones (acétylacétone, cyclohexane 1-3-dione). L'acétylméthylcarbinol, précurseur biologique du diacétyl, ne réagit pas non plus (WHITE et coll. 1946).

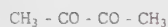
On constate donc que :

- seules les alpha-dicétones sont capables de réagir
- la présence d'un groupement méthyle en alpha d'un carbonyle est nécessaire (aussi bien avec les alpha-dicétones aliphatiques qu'avec les cyclaniques). La non réactivité de la 3-bromocyclopentane-dione pourrait être due à la présence de ce radical bromé voisin des deux fonctions cétoniques.

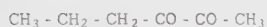
Il est fort probable, ainsi que NATELSON et coll. (1951) l'ont supposé qu'un hydrogène énoisable soit nécessaire.

* Nous remercions vivement le Professeur C. RAPPE de l'Université suédoise, d'Uppsala, qui nous a aimablement fait parvenir un échantillon de ce produit.

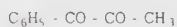
I - DICETONES DONNANT UNE REACTION POSITIVE AVEC L'UREE



DIACETYLE



ACETYLBUTYROYLE



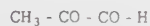
ACETYLbenzoyle



ACETYLisobutyroyle



ACETYLpropionyle



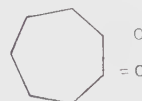
METHYLglyoxal



CYCLOhexane 1-2 DIONE

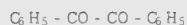


4-METHYLCYCLOhexane
1-2 DIONE



CYCLOheptane 1-2 DIONE

II - DICETONES OU COMPOSES APPARENTES NE DONNANT PAS DE REACTION COLOREE AVEC L'UREE



BENZILE



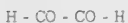
FURILE



BENZOINE



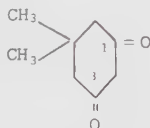
ACETYLMETHYLCARBINOL



GLYOXAL



ACETYLACETONE



DIMETHYLCYCLOhexane
1-3 DIONE



3 BROMO CYCLOPENTANE
1-2 DIONE

Les composés de structure $R - CO - CO - CH_3$ ou $R - \underline{CO - CO} - CH_3$

semblent donc seuls capables de réagir. La nature du radical R intervient dans les caractéristiques de la réaction colorée :

- la coloration jaune obtenue lorsque R est $-CH_3$ ou $CH < \begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}$ passe

au rouge par l'introduction de double liaisons supplémentaires ($R = \text{phényle}$). La nature de ce radical modifie également la cinétique de la réaction (Première Partie de ce Travail)

- les réactions colorées obtenues avec des alpha-dicétones linéaires et cyclaniques sont nettement différentes, en particulier du point de vue sensibilité (Conclusion - Deuxième Partie de ce Travail)

- de même un carbone supplémentaire (passage du cyclohexane au cycloheptane) modifie profondément la réaction colorée qui de violette devient jaune avec un développement très différent. La présence d'un groupement méthyle en 4 interfère également : la réaction colorée donnée par la 4-méthyl-nioxime est nettement plus faible que celle obtenue avec la nioxime, mais les caractéristiques de la réaction (spectre, cinétique) ne sont pas modifiées.

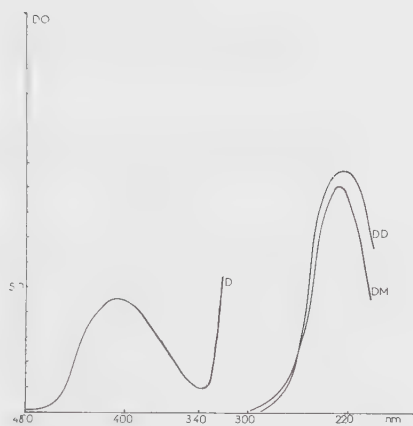
II - REACTIVITE DES OXIMES

Les monoximes, pour FEARON (1939) et ARCHIBALD (1945) ne représentaient qu'une forme stable des dicétones : elles s'hydrolysent en milieu acide pour donner les dicétones. Mais BEALE et CROFT (1961) après avoir constaté une moindre réactivité avec le diacétyl et une hydrolyse incomplète de la diacétylmonoxime dans leurs conditions opératoires, ont proposé une série d'hypothèses faisant intervenir le groupement $=N - OH$ des monoximes dans la formation des complexes colorés (voir introduction de la Troisième Partie).

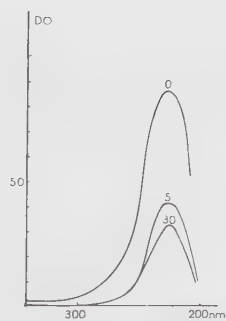
La comparaison des réactions obtenues avec le diacétyl, la diacétylmonoxime et la diacétyldioxime (voir conclusions de la Première Partie) nous fait rejeter ces hypothèses.

Dans les conditions opératoires les plus adaptées à chacun de ces composés, les réactions colorées (qui ont un spectre d'absorption rigoureusement superposable) sont d'intensité croissante de la diacétyldioxime à la diacétylmonoxime et au diacétyl. Les colorations inférieures obtenues avec le diacétyl par différents auteurs ont pour origine soit l'utilisation d'un produit non distillé, soit des conditions opératoires défavorables tel qu'un temps de chauffage prolongé ou un milieu sulfurique.

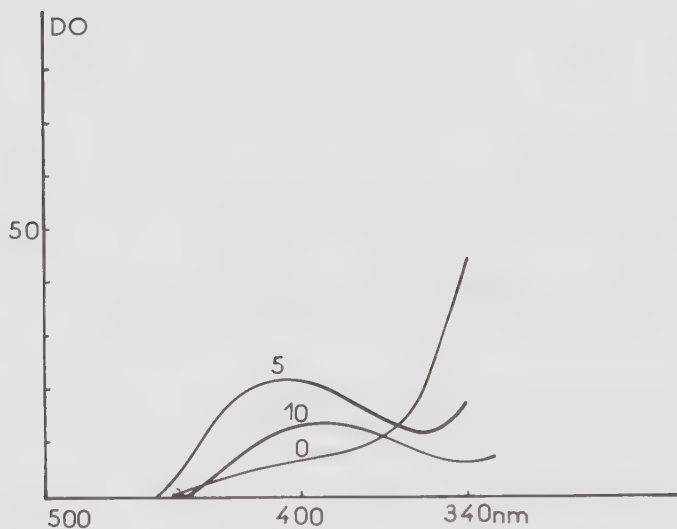
La cinétique est plus lente avec la diacétyldioxime qu'avec la diacétylmonoxime, elle-même moins rapide qu'avec le diacétyl : le temps nécessaire à l'hydrolyse de la dioxime ou de la monoxime est à l'origine des différences observées. Cette hydrolyse préalable est aussi la cause de l'acidité supérieure nécessaire avec la diacétyldioxime et à un degré moindre avec la diacétylmonoxime par rapport au diacétyl.



Graphique 46. Spectres d'absorption du diacétyle, de la diacétylmonoxime et de la diacétyldioxime



Graphique 47. Spectres d'absorption de la diacétylmonoxime (en solution M/10) avant et après chauffage en milieu arsénicosulfurique (BMB 5 et 30 mn)



Graphique 48. Formation de diacétyle pendant l'hydrolyse de la diacétylmonoxime en milieu arsénicosulfurique (temps 0, 5 et 10 mn)

La constatation de la réactivité supérieure du diacétyle enlève donc tout fondement aux hypothèses de BEALE et CROFT (1961). Néanmoins nous avons tenu à vérifier l'hydrolyse des oximes par l'examen des spectres ultra-violet.

1) Hydrolyse de la diacétylmonoxime et de la diacétyldioxime (étude spectrale)

La diacétylmonoxime et la diacétyldioxime ont un spectre d'absorption dans l'ultra-violet respectivement à 225 nm et à 222 nm, et le diacétyle à 405 nm (graphique 46).

C'est à la lecture du travail d'ENGLIS et coll. (1953) (qui ont proposé un dosage spectrophotométrique du diacétyle après transformation en diacétyldioxime absorbant fortement dans l'ultra-violet) que nous avons pensé suivre l'hydrolyse des oximes par leur spectre ultra-violet. Nous avons vérifié que, dans nos conditions opératoires (milieu arsénicosulfurique) les maximums n'étaient pas déplacés (ISRAELI 1965).

1 - Hydrolyse de la diacétylmonoxime en milieu acide et à 100° (en l'absence d'urée)

1 ml de diacétylmonoxime M/10 en milieu arsénicosulfurique (volume total 6 ml) est chauffé au bain-marie bouillant. Le spectre est enregistré au temps zéro et après 5 - 10 - 30 minutes de chauffage (graphique 47) après dilution (diacétylmonoxime M/10 000). On constate une hydrolyse rapide au début puis un ralentissement. Simultanément apparaît le diacétyle repérable par son spectre (après 5 minutes de chauffage) (graphique 48).

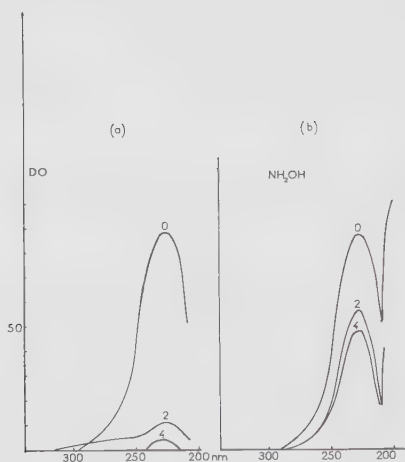
2 - Hydrolyse de la diacétylmonoxime en milieu acide et à 100° (en présence d'urée) ou d'hydroxylamine

Dans les conditions précédentes, nous avons ajouté 1 ml de solution d'urée M/10, M/100 et M/1000. Nous pensions que l'urée, au moins lorsqu'elle est en forte quantité se combinerait immédiatement au diacétyle libéré et favoriserait la poursuite de l'hydrolyse de l'oxime en éliminant un produit d'hydrolyse. Or, on constate que l'urée n'apporte aucune modification aux spectres obtenus précédemment.

L'introduction d'hydroxylamine en solution M/10 semble n'apporter également aucune perturbation à l'hydrolyse.

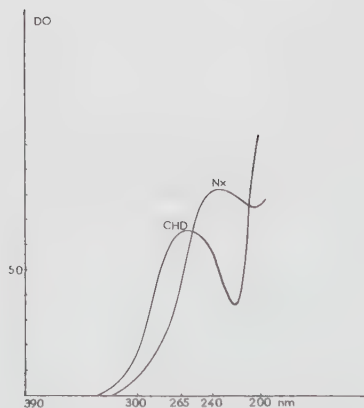
3 - Hydrolyse de faible quantité de diacétylmonoxime

Ces expériences ont été renouvelées sur une quantité plus faible de diacétylmonoxime (1 ml de solution M/100) afin d'obtenir peut-être une hydrolyse plus poussée.



Graphique 49 a. Spectres d'absorption de la diacétylmonoxime (en solution M/100) avant et après chauffage en milieu arsénicosulfurique (BMB 2 et 4 mn)

b. Spectres obtenus dans les conditions de **a** mais après addition d'hydroxylamine



Graphique 50. Spectres d'absorption de la nioxime et de la cyclohexanedione

Les spectres enregistrés au temps zéro et après 2 et 4 minutes de chauffage (graphique 49a) montrent une hydrolyse rapide et pratiquement complète.

Tandis que l'urée reste inactive sur l'hydrolyse, l'hydroxylamine en forte quantité (1 ml de solution M/10) interfère : il y a ralentissement de l'hydrolyse (graphique 49b).

4 - Hydrolyse à 37°

Les mêmes essais ont été effectués en utilisant la température de 37°. Comme on pouvait s'y attendre, l'hydrolyse est moins rapide : après 60 minutes de bain-marie, même avec la diacétylmonoxime M/100, l'hydrolyse n'est pas complète.

5 - Hydrolyse de diacétyldioxime

Les résultats sont similaires. Mais dans tous les cas, l'hydrolyse de la diacétyldioxime est plus lente que celle de la diacétylmonoxime.

2) Hydrolyse de la nioxime

La nioxime en solution aqueuse et en milieu acide présente un maximum d'absorption à 240 nm (graphique 50).

Par chauffage en milieu acide à 37° dans les conditions utilisées pour développer une réaction colorée, cette dioxime s'hydrolyse aussi. On peut suivre la formation de cyclohexanedione par l'examen du spectre d'absorption, de la dicétone qui a son maximum à 260 nm (graphique 50). Après 60 minutes à 37° en milieu arsénicosulfurique, on ne retrouve pratiquement qu'un seul pic ayant un maximum à 260 nm.

L'examen des spectres ultra-violets a montré que les dioximes ou les monoximes traitées dans les conditions décrites dans la Première et la Deuxième Parties de ce Travail, s'hydrolysent plus ou moins rapidement pour donner des dicétones. L'hydrolyse de la nioxime est totale : celle de la diacétylmonoxime à la concentration trouvée la plus favorable (1 ml de diacétylmonoxime M/10) n'est que partielle, mais elle est totale en solution diluée (M/100). L'urée ne modifie pas la vitesse d'hydrolyse tandis que l'hydroxylamine à forte concentration ralentit l'hydrolyse de la diacétylmonoxime en solution diluée.

CONCLUSION

L'étude de la réactivité des dicétones avec les dérivés carbamidés semble montrer que seules les alpha-dicétones ayant un groupement méthyle libre à proximité d'une des fonctions carbonyle, peuvent donner une coloration.

Par l'étude de la réactivité du diacétyl, comparée à celle de ses oximes nous pouvons éliminer les hypothèses de BEALE et CROFT faisant intervenir le groupement $=N-OH$, dans la structure des complexes colorés, le diacétyl ne possédant pas ce groupement. L'examen des spectres ultra-violets confirme l'hydrolyse des oximes dans le milieu acide.

CHAPITRE DEUXIEME

ETUDE DES REACTIONS COLOREES DE DERIVES SUBSTITUES DE L'UREE

Les réactions colorées avec des alpha-dicétones ont surtout été appliquées à trois dérivés carbamidés : l'urée, la citrulline et l'allantoïne. Mais d'autres composés carbamidés donnent des réactions positives :

- semicarbazide et dérivés, méthylurée, tolylurée, benzylurée (SMITH 1935)
- méthylurée, butylurée, phénylurée, bêta-naphtylurée, diméthylurée, symétrique et asymétrique, acide alpha-amino-alpha-carbamidopimélique (FEARON 1939)
- dérivés carbamidés des acides propionique, n-butyrique, n-valérique isobutyrlacétique, gamma-guanidovalérique, aminovalérique et pipéridique, méthylurée, phénylurée, complexes acides gras - urée (CORNALL et HUNTER 1941)
- acides allantoïque et alloxanique, alloxanthine, acide parabanique, alloxane et biuret (ARCHIBALD 1944)
- dérivés N-carbamylés des acides glutamique et aspartique et de la glycine, de l'alanine, de la leucine et de l'arginine (KORITZ et COHEN 1954)
- viomycine (JACKSON 1954)
- dérivés carbamidés provenant de l'oxydation des bases puriques et pyrimidiques (KIDO 1958)
- phénacétylurée, sulfanilyl-n-butylurée, bromisovalérylurée (KITAMURA et IUCHI 1959)
- dérivés-N-carbamylés des acides aspartique et glutamique, de l'alanine, de la glycine, de la taurine (CROKAERT et SCHRAM 1958)
- phénylurée (BEALE et CROFT 1961)
- méthylurée, éthylurée, phénylurée, dérivés N-carbamylés de la glycine, des acides aspartique et glutamique (Mc LEAN et coll. 1965).

Tous ces composés ont été testés avec le diacétyl et ses oximes dans des conditions très différentes les uns des autres. Les résultats ne peuvent donc être comparés : la phénylurée qui donne par exemple avec la diacétylmonoxime une réaction colorée d'intensité plus faible que celle de l'urée, réagit plus fortement après introduction de diphenylparaaminosulfonate (KORITZ et COHEN 1954) et d'après les résultats de BEALE et CROFT (1961) les colorations sont d'intensité voisine en présence d'acide phénylanthranilique.

ARCHIBALD (1945) a comparé la réactivité de dérivés carbamidés avec la phénylpropanedione monoxime : l'urée, la méthylurée, la phénylurée, et la citrulline réagissent avec la phénylpropanedione monoxime. La N-hydroxyéthyl-N-phénylurée et N-2-méthyl-4-bromophényl-N' éthylurée ne donnent que de très faibles colorations. Enfin un dérivé trisubstitué ou disubstitué symétrique est incapable de former un complexe coloré.

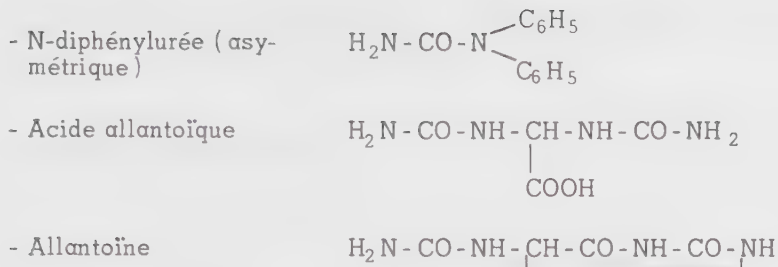
L'étude de la réactivité des dérivés de l'urée permet de faire un choix entre les différentes formules possibles de complexes colorés : un dérivé disubstitué asymétrique



ne peut pas par exemple former de cycle pyrimidique (voir introduction de la Troisième Partie de ce Travail).

Personnellement nous avons étudié les réactions colorées des dérivés carbamidés suivants avec les alpha-dicétones aliphatiques et cyclaniques.

- Urée	$H_2N - CO - NH_2$
- N-méthylurée	$H_2N - CO - N \begin{array}{l} H \\ CH_3 \end{array}$
- N-éthylurée	$H_2N - CO - N \begin{array}{l} H \\ CH_2 - CH_3 \end{array}$
- citrulline	$H_2N - CO - N \begin{array}{l} H \\ CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH \begin{array}{l} NH_2 \\ COOH \end{array} \end{array}$
- N' Acétyl-N-méthylurée	$H_3C - CO - N \begin{array}{l} H \\ \end{array} - CO - N \begin{array}{l} H \\ CH_3 \end{array}$
- Biuret	$H_2N - CO - NH - CO - NH_2$
- N-Phénylurée	$H_2N - CO - N \begin{array}{l} H \\ C_6H_5 \end{array}$
- N-naphtylurée	$H_2N - CO - N \begin{array}{l} H \\ C_{10}H_7 \end{array}$
- N-N'-Diphénylurée (symétrique)	$C_6H_5 - N \begin{array}{l} H \\ \end{array} - CO - N \begin{array}{l} H \\ C_6H_5 \end{array}$



Nous avons préparé des solutions de même molarité afin de pouvoir comparer les intensités des colorations données par chaque dérivé carbamidé plus ou moins substitué. La naphthylurée et les diphénylurées insolubles dans l'eau sont d'abord dissoutes dans le méthanol (solution M/50) puis ces solutions concentrées sont diluées dans l'eau. Les conditions opératoires utilisées reposent sur les résultats trouvés précédemment avec l'urée.

A - ETUDE DES REACTIONS DES DERIVES CARBAMIDES AVEC CHAQUE DICETONE

I - REACTIONS AVEC LE DIACETYLE ET LA DIACÉTYLMOXIME

Conditions opératoires

a) en milieu arsénicosulfurique

- Solution de dérivés M/200 1 ml
- Diacétyle ou diacétylmonoxime M/10 1 ml
- Réactif arsénicosulfurique 2 ml
- Eau distillée q.s.p. 6 ml

Bain-marie bouillant 10 minutes avec le diacétyle et 20 minutes avec la diacétylmonoxime

b) en milieu phosphorique

- Solution de dérivés carbamidés M/2000 0,5 ml
- Diacétyle ou diacétylmonoxime M/10 1 ml
- Acide phosphorique (diacétyle) 2 ml
..... (diacétylmonoxime) ... 2,5 ml
- Eau distillée q.s.p. 6 ml

Bain-marie bouillant 60 minutes pour la diacétylmonoxime et 40 minutes avec le diacétyle

c) en milieu phosphoferrique

- Solution de dérivés carbamidés M/2000 1 ml
- Diacétylmonoxime M/10 1 ml
- Réactif phosphoferrique 4 ml

Bain-marie bouillant 8 minutes

Résultats

Comme l'avaient déjà observé ARCHIBALD (1944) et d'autres auteurs ensuite, les colorations des dérivés carbamidés diffèrent de celle obtenue avec l'urée :

- Urée : jaune (478 nm)
- Méthylurée, éthylurée, acétylméthylurée : jaune orangé (485 nm)
- Citrulline : orangé (490 nm)
- Phénylurée et naphtylurée : rose orangé (495 nm)

Les maximums d'absorption notés entre parenthèses correspondent à ceux obtenus en milieu arsénicosulfurique ; en milieu phosphorique il y a un léger décalage de 3 à 4 nm vers l'ultra-violet.

La présence d'une chaîne latérale a donc pour première conséquence un glissement du maximum d'absorption vers le rouge.

Ces différences de coloration nous ont obligés à effectuer les lectures à plusieurs longueurs d'onde. Mais, dans un but de simplification, nous ne présentons dans le tableau 58 que les intensités lues à 480 et 490 nm. Ces deux longueurs d'onde permettent de rendre compte des variations de couleur observées.

Tableau 58 : Intensités des réactions colorées données par des dérivés substitués de l'urée avec le diacétyle et sa monoxime

Milieu acide	Diacétylmonoxime						Diacétyle					
	PO ₄ H ₃		Arsénicosulfurique		Phosphoferrique		PO ₄ H ₃		Arsénicosulfurique		Phosphoferrique	
Longueur d'onde nm	480	490	480	490	480	490	480	490	480	490	480	490
Urée	0,26	0,16	0,22	0,15	0,10	0,06	0,55	0,34	0,15	0,10	0,19	0,11
Méthylurée	0,60	0,51	0,27	0,24	0,37	0,33	0,54	0,48	0,22	0,20	0,29	0,25
Ethylurée	0,57	0,55	0,35	0,35	0,45	0,44	0,56	0,55	0,27	0,26	0,40	0,39
Citrulline	0,31	0,35	0,38	0,43	0,27	0,30	0,52	0,59	0,31	0,35	0,25	0,28
Acétylméthylurée	0,60	0,51	0,27	0,24	0,38	0,34	0,53	0,47	0,21	0,20	0,28	0,24
Phénylurée	0,13	0,17	0,15	0,18	0,09	0,11	0,19	0,25	0,12	0,14	0,17	0,21
Naphtylurée	0,07	0,07	0,10	0,12	0,10	0,10	0,08	0,10	0,11	0,11	0,10	0,11
Biuret	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diphénylurée symétrique	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diphénylurée asymétrique	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Le biuret, la diphenylurée symétrique et asymétrique à la concentration indiquée ne réagissent ni avec le diacétyle, ni avec la diacétylmonoxime. La coloration donnée par l'urée est en général plus faible que celle de la méthylurée, éthylurée et acétylméthylurée, et de la citrulline.

La phénylurée et la naphtylurée réagissent plus faiblement que la méthyl ou l'éthylurée. Nous nous attendions à l'inverse, vu l'introduction de doubles liaisons supplémentaires avec les substituants aromatiques.

II - REACTIONS AVEC LA PHENYLPROPANEDIONE ET SA MONOXIME

Conditions opératoires

	- Dérivé carbamidés M/1000	1 ml
	- Phénylpropanedione ou phénylpropanedione M/5 dans l'éthanol	0,5 ml
	- PO_4H_3 (avec la phénylpropanedione)	3 ml
	- (avec la phénylpropanedionemonoxime) ..	3,5 ml
ou	- Réactif arsénicosulfurique	3 ml
	- Eau distillée q.s.p.	6 ml

Résultats

Les colorations rouges obtenues sont très proches les unes des autres. Le spectre dans le visible de cette réaction colorée est plus étalé. C'est pourquoi les variations de couleur sont peu importantes. Seule la naphtylurée donne une coloration violet-rouge.

Les maximums d'absorption se trouvent à :

- 550 nm avec la naphtylurée
- 540 nm avec l'urée et la phénylurée
- 530 nm avec la méthylurée et l'acétylméthylurée
- 520 nm avec l'éthylurée et la citrulline

Nous présentons dans le tableau 59 les intensités de colorations lues à 540 nm.

Tableau 59 : Intensités des réactions colorées données par des dérivés substitués de l'urée avec la phénylpropanedione et la phénylpropanedionemono-
xime

Lecture à 540 nm	Phénylpropanedione		Phénylpropanedionemono- xime	
	Milieu phosphorique	Milieu arsénicosul- furique	Milieu phosphorique	Milieu arsénicosul- furique
Urée	0,69	1,1	0,50	0,98
Méthylurée	0,23	0,61	0,23	0,59
Ethylurée	0,11	0,38	0,1	0,35
Citrulline	0,05	0,23	0,03	0,18
Acétylméthylurée	0,20	0,64	0,23	0,58
Phénylurée	0,10	0,33	0,12	0,34
Naphtylurée	0	violet	0	violet
Biuret	0	0,07	0	0,08
Diphénylurée symétrique	0	0	0	0
Diphénylurée asymétrique	0	0	0	0

Les diphénylurées ne donnent pas de coloration. Par contre le biuret réagit avec ces composés. Tous les autres dérivés substitués essayés donnent des colorations d'intensité plus faible que celle de l'urée. Le biuret et la naphthylurée ne réagissent qu'en milieu arsénicosulfurique. La naphthylurée donne en outre un précipité dans tous les milieux acides.

Les réactions colorées sont plus intenses en milieu arsénicosulfurique et dans les deux milieux acides, la coloration diminue au fur et à mesure que s'accroît la longueur de la chaîne latérale.

La phénylpropanedione et la phénylpropanedionemonoxime réagissent d'une façon similaire avec l'ensemble des dérivés carbamidés étudiés.

La réaction avec cette dicétone est donc plus spécifique de l'urée (ARCHIBALD 1945).

III - REACTIONS AVEC L'HEPTOXIME

Conditions opératoires

a) milieu phosphorique

- Dérivé carbamidé M/ 500 1 ml
- Heptoxime 0,4 g % 1 ml
- PO_4H_3 4 ml

Bain-marie bouillant 60 minutes

b) milieu arsénicosulfurique concentré

- Dérivé carbamidé M/ 250 1 ml
- Heptoxime 0,4 g % 1 ml
- Réactif acide (25 g d' AsO_4H_3 pour 100 ml de SO_4H_2 dilué au demi) 4 ml

Bain-marie bouillant 30 minutes

Résultats

Nous n'avons pas obtenu de réaction colorée avec les diphenylurées. Les autres composés donnent des colorations jaunes ou orangées dont les maximums d'absorption sont en milieu phosphorique :

- 475 nm pour l'urée
- 488 nm pour la méthyl, l'éthyl, l'acétylméthylurée et la citrulline
- 490 nm pour la phénylurée.

La naphtylurée et le biuret réagissent faiblement. Dans le tableau 60 sont présentées les résultats des lectures faites à 480 et 490 nm.

Tableau 60 : Intensités des réactions colorées de dérivés substitués de l'urée avec l'heptoxime

nm	Milieu phosphorique		Milieu arsénicosulfurique concentré	
	480	490	480	490
Urée	0,77	0,59	0,46	0,38
Méthylurée	0,68	0,71	0,58	0,59
Ethylurée	0,74	0,78	0,45	0,47
Citrulline	0,82	0,86	0,36	0,37
Acétylméthylurée	0,73	0,75	0,60	0,58
Phénylurée	0,57	0,64	0,39	0,38
Naphtylurée	0,15	0,15	0,27	0,26
Biuret	0,12	0,10	0,12	0,10
Diphénylurée symétrique	0	0	0	0
Diphénylurée asymétrique	0	0	0	0

Les intensités des colorations données par l'urée et les dérivés substitués sont voisines.

IV - REACTIONS AVEC LA CYCLOHEXANEDIONE

Conditions opératoires

- Dérivé carbamidé M/ 50 1 ml
- Cyclohexanedione M/ 50 2 ml
- Acide phosphorique ou réactif arsénicosulfurique 3 ml

Bain-marie 45° : 30 minutes

Résultats

- en milieu phosphorique, le biuret et les diphénylurées ne réagissent pas. L'urée, la méthylurée, l'éthylurée et l'acétylméthylurée développent des colorations violettes (570 nm). La phénylurée et la naphtylurée donnent une coloration bleue (590 nm).

Ces colorations évoluent ensuite et on peut observer des différences de teinte légère entre l'urée et la méthyl ou l'éthylurée. La coloration de l'acétylméthylurée, très faible au départ (voir tableau) est alors intense.

- en milieu arsénicosulfurique, les diphénylurées ne donnent pas de réaction positive, ni à première observation le biuret.

Les colorations obtenues sont à la sortie du bain-marie :

- . roses avec l'urée et l'éthylurée
- . orangées avec la méthylurée et l'acétylméthylurée
- . bleue avec la phénylurée
- . violette avec la naphtylurée

On observe également une fluorescence verte avec les quatre premiers composés. Les colorations évoluent ensuite et après 24 heures, il est possible par simple observation visuelle de différencier très nettement l'urée des autres composés : coloration bleue avec l'urée, rouges avec la méthylurée, l'éthylurée et l'acétylméthylurée, vertes avec la phénylurée et la naphtylurée. On note également l'apparition d'une faible coloration avec le biuret.

Dans le tableau 61 nous présentons les lectures des colorations à 570 nm.

Tableau 61 : Intensités des réactions de dérivés substitués de l'urée avec la cyclohexanedione

	Milieu phosphorique	Milieu arsénico-sulfurique
Urée	0,78	0,42
Méthylurée	0,79	0,37
Ethylurée	1,22	0,46
Acétylméthylurée	0,18	0,41
Phénylurée	0,48	1,35
Naphtylurée	0,12	précipité
Biuret	0	0
Diphénylurée symétrique	0	0
Diphénylurée asymétrique	0	0

V - REACTIONS AVEC LA NIOXIME

Conditions opératoires

a) milieu phosphorique

- Dérivés substitués de l'urée M/ 50 1 ml
- PO_4H_3 3 ml
- Nioxime M/ 25 1 ml
- Eau distillée q.s.p. 6 ml

Bain-marie 37° : 60 minutes

Lecture à 575 nm

b) milieu chlorhydrique

- Dérivés substitués de l'urée M/ 50 0,5 ml
- HCl 1,5 ml
- Nioxime M/ 25 1 ml
- Eau distillée q.s.p. 6 ml

Bain-marie 37° : 120 minutes

Lecture à 575 nm

Résultats

Le biuret et les diphenylurées ne réagissent pas avec la nioxime. La naphthylurée (qui précipite en milieu chlorhydrique) et la phénylurée donnent des colorations bleu violet et les autres composés des colorations violettes.

Tableau 62 : Intensité des réactions colorées des dérivés substitués de l'urée avec la nioxime

	Milieu phosphorique	Milieu chlorhydrique
Urée	0,65	1,3
Méthylurée	1,45	1,98
Ethylurée	1,93	2,08
Citrulline	2,08	1,98
Acétylméthylurée	0,16	0,88
Phénylurée	0,84	0,83
Naphtylurée	0,10	précipité
Biuret	0	0
Diphénylurée symétrique	0	0
Diphénylurée asymétrique	0	0

Dans les deux milieux acides, la méthylurée, l'éthylurée et la citrulline réagissent plus fortement que l'urée. L'acétylméthylurée donne une réaction colorée peu intense en milieu phosphorique, mais voisine de celle des autres dérivés substitués en milieu chlorhydrique. La coloration de la naphtylurée est faible parce que ce composé a été introduit en solution dans le méthanol. Or 1 ml de ce solvant provoque un net affaiblissement de la réaction colorée (1 ml d'urée M/50, 0,13 au lieu de 0,65 en milieu phosphorique).

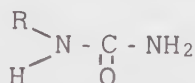
En milieu arsénicosulfurique à 45°, les résultats obtenus sont du même ordre que dans les deux autres milieux acides. On observe en plus l'apparition d'une fluorescence verte avec l'urée, la méthylurée, l'éthylurée. L'acétylméthylurée réagit plus faiblement. En utilisant la température de 100°, le biuret donne une réaction positive et l'acétylméthylurée une réaction intense. L'acétone intensifie les réactions colorées de tous les composés.

CONCLUSION

De cette étude générale des réactions de dérivés carbamidés avec les alpha-dicétones étudiées dans la Première et la Deuxième Partie de ce Travail, il est possible de tirer les constatations suivantes :

1) Du point de vue réactivité

Les dérivés monosubstitués de l'urée donnent une réaction positive



Cette constatation exclut donc certaines combinaisons décrites dans l'Introduction de la Troisième Partie : hypothèse de DICKENMANN et coll. (1954) et la combinaison 6 c qui semblait possible.

Nous ne pouvons tirer de conclusions générales des résultats négatifs obtenus avec un seul dérivé disubstitué symétrique et asymétrique. En effet, le deuxième dérivé disubstitué essayé, l'acétylméthylurée s'hydrolyse en milieu acide pour donner la méthylurée. C'est pourquoi, ce composé donne toujours une coloration de même spectre et de même intensité que la méthylurée, sauf avec la cyclohexanedione et sa dioxime : en effet avec ces dicétones, les conditions opératoires plus douces (milieu phosphorique et 37°) ne provoquant qu'une hydrolyse progressive de l'acétylméthylurée.

Le biuret ne semble réagir qu'après hydrolyse aussi.

2) Du point de vue spectre des colorations

Lorsqu'un dérivé substitué de l'urée réagit avec les alpha-dicétones le maxima d'absorption de la réaction colorée est déplacé vers les grandes longueurs d'ondes.

Si ce n'est pas le cas, le dérivé substitué se sera hydrolysé au préalable en urée.

3) Du point de vue intensité des colorations

Les dérivés ayant une chaîne latérale donnent en général une réaction colorée plus intense que l'urée sauf avec la phénylpropanedione. La réaction phénylpropanedione-urée est donc plus spécifique de l'urée.

La phénylurée et la naphtylurée ne donnent pas de réaction colorée plus intense que les autres composés, contrairement à ce que l'on pouvait espérer, vu l'introduction de doubles liaisons supplémentaires.

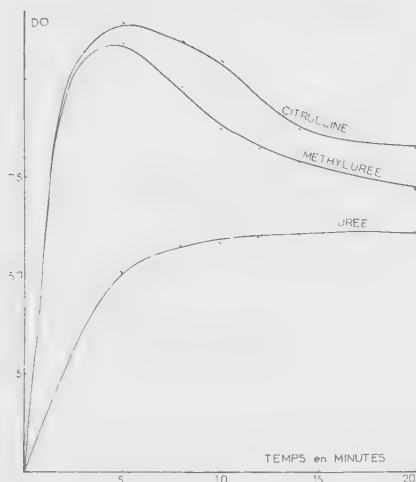
Mais les conditions opératoires retenues pour cette étude comparative étaient celles trouvées les plus favorables pour l'urée. Or, au cours de nos essais, nous nous sommes aperçus que les intensités relatives de ces composés pouvaient être modifiées par les conditions opératoires :

- l'acidité
- l'introduction de substances interférentes (l'addition de thiosemicarbazide par exemple aux réactions avec la phénylpropanedione a pour conséquence de donner des colorations plus intenses avec les dérivés substitués qu'avec l'urée, ce qui est l'inverse de ce que nous avons observé page 186)
- le temps de chauffage

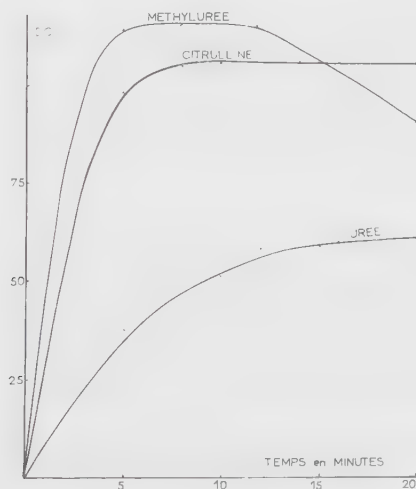
Les graphiques 51 et 52 présentent les cinétiques des réactions colorées de l'urée, de la méthylurée et de la citrulline avec le diacétyl et la diacétylmonoxime en milieu arsénicosulfurique. On observe des différences très nettes. Les dérivés substitués donnent une réaction colorée se développant plus rapidement que celle de l'urée.

Ces résultats ont été confirmés avec l'éthylurée et la phénylurée. Cette observation est importante car le choix d'un temps de chauffage peut permettre d'améliorer la spécificité d'une réaction colorée en limitant la réaction colorée d'un deuxième composé présent simultanément.

Les réactions des dérivés substitués de l'urée n'ont donc pas les mêmes caractéristiques que celles de l'urée. Pour chaque dérivé carbamidé, il faudra étudier les conditions opératoires, et définir les réactifs adéquats. C'est ce que nous avons fait avec trois dérivés carbamidés d'intérêt biologique : la citrulline, l'allantoïne et l'acide allantoïque.



Graphique 51. Cinétiques des réactions colorées de l'urée, de la méthylurée et de la citrulline avec le diacétyle en milieu arsénicosulfurique



Graphique 52. Cinétiques des réactions colorées de l'urée de la méthylurée et de la citrulline avec la diacétylmonoxime en milieu arsénicosulfurique

B - ETUDE PARTICULIERE DE LA CITRULLINE, DE L'ALLANTOINE ET DE L'ACIDE ALLANTOIQUE

I - LA CITRULLINE

L'examen des résultats précédents a mis en évidence que la citrulline donne une réaction colorée plus intense que l'urée sauf avec la phénylpropanedione ou sa monoxime.

Nous avons donc retenu la diacétylmonoxime pour obtenir une réaction colorée très sensible en vue d'applications biologiques et nous avons rapidement défini les caractéristiques de cette réaction en utilisant des protocoles opératoires identiques à ceux de l'urée afin de pouvoir les comparer.

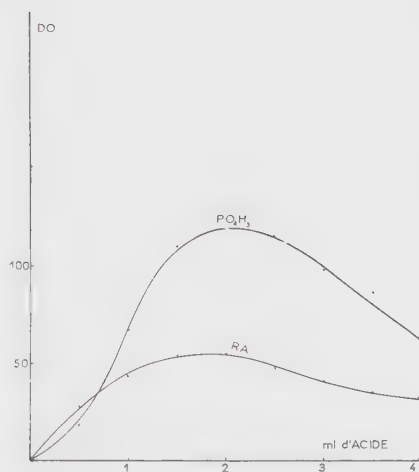
Le graphique 53 montre que les concentrations les plus favorables en acide sont 2,5 ml de PO_4H_3 ou 2 ml de réactif arsénicosulfurique. Ces résultats ont été obtenus avec 0,5 ml de solution M/1000 de citrulline, 1 ml de diacétylmonoxime M/10 pour un volume total de 6 ml. Bain-marie bouillant 60 minutes en milieu phosphorique et 10 minutes en milieu arsénicosulfurique. Nous avons vérifié que les résultats trouvés étaient indépendants du temps de chauffage. Les quantités les plus favorables sont donc identiques à celles trouvées pour l'urée (voir Chapitre Premier, Première Partie).

Nous avons ensuite recherché la concentration la plus favorable en diacétylmonoxime. Le graphique 54 montre les résultats obtenus pour 0,5 ml de citrulline M/1000 dans les deux milieux acides précédemment définis : 0,6 ml de diacétylmonoxime M/10 en milieu arsénicosulfurique et 0,2 ml en milieu phosphorique sont suffisants pour développer une réaction colorée intense. Les quantités sont nettement inférieures à celles trouvées pour l'urée (voir Chapitre Deuxième, Première Partie).

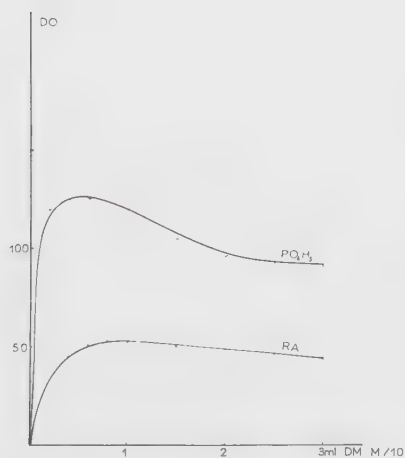
Nous avons déjà fait remarquer que la citrulline donnait une réaction se développant plus rapidement que celle de l'urée. Avec les quantités d'acide et de diacétylmonoxime que nous venons de définir, nous avons précisé la cinétique en milieu phosphorique et arsénicosulfurique (graphique 55). Par comparaison aux graphiques 3 et 5, nous pouvons en effet nettement remarquer le développement plus rapide de la réaction citrulline-diacétylmonoxime.

De plus en milieu arsénicosulfurique où les colorations sont déjà entièrement développées après 7-8 minutes, le prolongement du chauffage est néfaste.

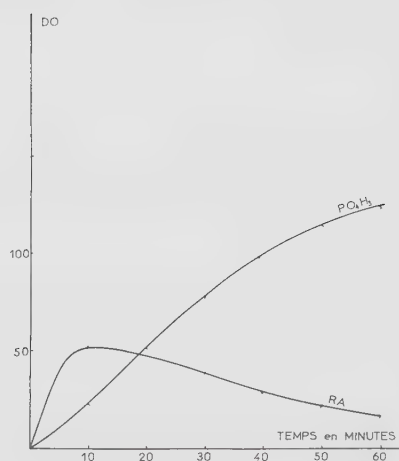
Les oxydants, les sels métalliques, l'acétone et les substances intensifiantes restent actifs avec la citrulline. Nous avons particulièrement étudié la réaction en présence de phénazone en milieu arsénicosulfurique : la citrulline développe une coloration jaune citron (maximum d'absorption à 462 nm) très sensible.



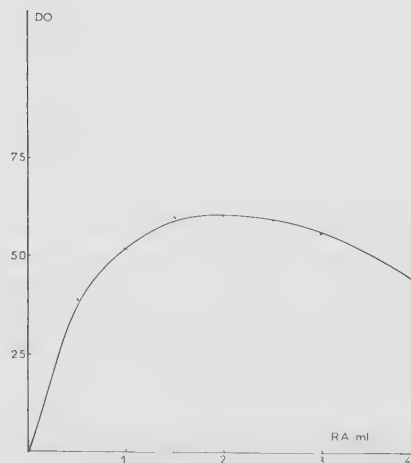
Graphique 53. Réaction citrulline-diacétylmonoxime
Intensité en fonction de la quantité de réactif acide



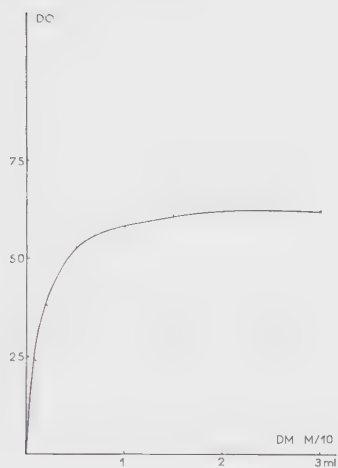
Graphique 54. Réaction citrulline-diacétylmonoxime
Intensité en fonction de la quantité de diacétylmonoxime en milieu
phosphorique (BMB 60 mn) et arsénicosulfurique (BMB 10 mn)



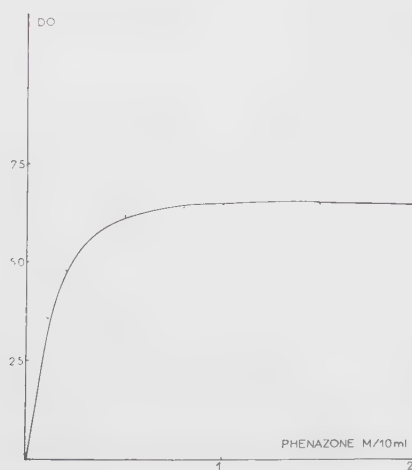
Graphique 55. Réaction citrulline-diacétylmonoxime
Cinétique en milieu arsénicosulfurique et phosphorique



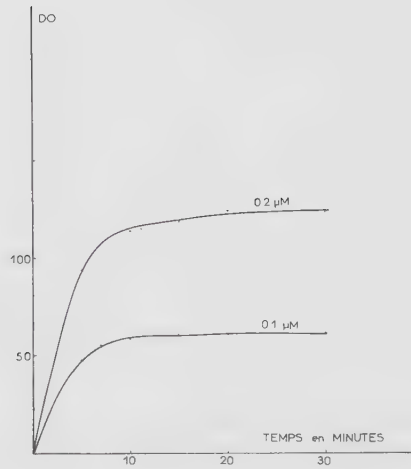
Graphique 56. Réaction citrulline-diacétylmonoxime en présence de phénazone
Intensités en fonction de la quantité de réactif arsénicosulfurique



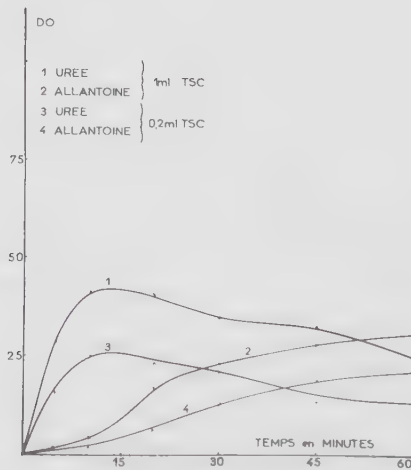
Graphique 57. Réaction citrulline-diacétylmonoxime en présence de phénazone
 Intensités en fonction de la quantité de diacétylmonoxime en milieu
 arsénicosulfurique



Graphique 58. Réaction citrulline-diacétylmonoxime en présence de phénazone
 Intensité en fonction de la quantité de phénazone en milieu
 arsénicosulfurique



Graphique 59. Réaction citrulline-diacétylmonoxime en présence de phénazone
Cinétiques en milieu arsénicosulfurique (0,1 et 0,2 µ M de citrulline)



Graphique 60. Cinétiques des réactions colorées de l'urée et de
l'allantoïne en présence de thiosemicarbazide en milieu
arsénicosulfurique

Nous avons défini les concentrations optima en réactif arsénicosulfurique en diacétylmonoxime et en phénazone (graphique 56, 57 et 58). Pour 0,5 ml de citrulline M/ 5000 (17,5 μ g), les concentrations les plus favorables sont 1,5 à 2 ml de réactif arsénicosulfurique, 1 à 2 ml de diacétylmonoxime M/ 10 et 0,5 à 1 ml de phénazone M/ 10.

Nous retiendrons en vue d'applications biologiques 2 ml de réactif arsénicosulfurique et pour éviter les blancs réactifs trop colorés, les quantités minima des autres réactifs, 1 ml de diacétylmonoxime M/ 10 et 0,5 ml de phénazone M/ 10 pour un volume total de 6 ml.

Le graphique 59 précise la cinétique de cette réaction. Un temps de chauffage de 10 minutes est donc suffisant. Ces conditions opératoires sont les plus favorables lorsqu'il ne se pose pas de problème de stabilité ou de photosensibilité. Mais si les conditions de travail l'exigent (délai important avant les lectures, forte luminosité sur le lieu de travail) il faut augmenter le temps de chauffage et les quantités de réactif arsénicosulfurique et de diacétylmonoxime pour améliorer la photostabilité.

II - ALLANTOINE ET ACIDE ALLANTOIQUE

Nous avons effectué une étude séparée de ces composés parce que dès le départ, nous avons été frappé par le fait que ces composés développaient avec la diacétylmonoxime des réactions colorées jaunes dont les spectres étaient exactement superposables à celui de l'urée, alors que tous les dérivés substitués donnaient des colorations différentes. Il semblait donc qu'il y avait hydrolyse partielle de ces composés avec formation d'urée qui réagissait.

a) Etude de la réaction allantoïne-diacétylmonoxime

ARCHIBALD (1944) avait déjà signalé que la réaction allantoïne-diacétylmonoxime ne se développait que lentement. Nous avons tenté de modifier la cinétique de cette réaction colorée pour diminuer le temps de chauffage nécessaire (SIEST 1965). Nous avons montré qu'avec ce composé une plus grande acidité du milieu était nécessaire (par exemple avec HCl la quantité la plus favorable est 2,5 ml au lieu de 1,5 ml avec l'urée). Quel que soit le réactif acide, la coloration ne se développe que lentement. L'addition d'oxydants, de métaux ou même de substances intensifiantes ne permet pas d'améliorer ce fait. Par exemple, après addition de thiosemicarbazide, la réaction continue à se développer après 60 minutes de chauffage alors que celle de l'urée a atteint son intensité maxima après 10 minutes en milieu arsénicosulfurique (graphique 60).

Tous ces résultats sont en faveur d'une hydrolyse progressive de l'allantoïne en urée, par chauffage en milieu acide.

b) Etude de la réaction acide allantoïque-diacétylmonoxime

L'acide allantoïque donne une réaction colorée ayant tous les caractères de celle de l'urée. Les quantités optima d'acide et de diacétylmonoxime, les cinétiques de réactions, les effets des différents composés interférents sont exactement les mêmes. Mais l'intensité de la coloration d'une quantité équimoléculaire d'acide allantoïque est double de celle de l'urée.

Il est donc vraisemblable qu'une molécule d'acide allantoïque s'hydrolyse en deux molécules d'urée.

CONCLUSION

Les résultats obtenus avec la citrulline mettent en évidence que la réaction colorée obtenue avec ce composé ne diffère essentiellement de celle de l'urée que par le spectre et la cinétique.

Au contraire les caractères des réactions colorées de l'allantoïne et de l'acide allantoïque semblent montrer que ces composés s'hydrolysent, lentement pour l'allantoïne et rapidement pour l'acide allantoïque, en donnant de l'urée.

CHAPITRE TROISIEME

ETUDE PAR LA METHODE DES VARIATIONS CONTINUES DE JOB

La méthode des variations continues de Job (1928) permet de déterminer les proportions relatives de deux substances A et B formant un complexe coloré A B



Si on mélange des quantités variables de solutions contenant respectivement A et B, certaines propriétés physico-chimiques du mélange varient avec la composition de ce dernier. Les propriétés sont maxima lorsque le mélange aura la composition correspondant exactement à la formule $A_m B_n$ ce qui permet de déterminer le rapport $\frac{A_m}{B_n}$

Job a montré que cette composition, qu'il appelle composition maxima, est indépendante du titre des solutions employées. Mais le titre des deux solutions doit être identique, elles devront donc être équimoléculaires.

Les propriétés physico-chimiques dont on étudie la variation peuvent être par exemple la viscosité, l'indice de réfraction, la conductibilité, l'absorption lumineuse.

La méthode des variations continues, étudiée par spectrophotométrie donne de bons résultats dans la détermination de la formule des complexes colorés, à condition d'effectuer les mesures à diverses longueurs d'onde ; Il faut opérer à toutes les longueurs d'onde où le complexe absorbe fortement la lumière.

Nous avons suivi la technique de LAZARE (1959) en mesurant les variations de l'absorption lumineuse.

Des essais préliminaires nous ont permis dans chaque cas de préciser les concentrations de dicétone et d'urée à utiliser. En effet, nous savons que pour avoir une réaction colorée intense avec les dérivés carbamidés, il faut en général un excès de dicétone (voir Première Partie de ce Travail).

Or, la méthode de Job nécessite pour sa réalisation que les deux composés entrant en réaction soient en solutions équimoléculaires. Suivant la sensibilité de la réaction colorée nous avons utilisé des solutions équimoléculaires de dérivé carbamidé et de dicétone M/50 à M/800.

Les réactifs acides et les proportions introduites dans les milieux réactionnels correspondent aux résultats obtenus précédemment. Nous avons effectué

cette étude avec l'urée et les réactifs dicétoniques décrits dans les pages précédentes, et nous avons ensuite vérifié l'influence des variations de conditions opératoires ou l'effet des diverses substances interférant dans la réaction colorée. Enfin nous avons appliqué la méthode de Job à différents dérivés carbamidés.

I - APPLICATION DE LA METHODE DE JOB AUX REACTIONS UREE-ALPHA-DICETONES

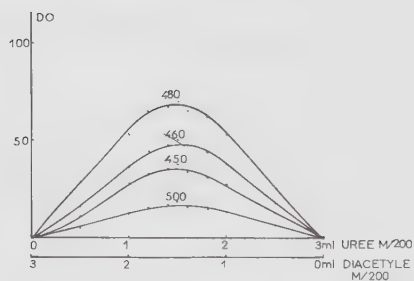
Nous avons effectué des essais par la méthode des variations continues avec chaque dicétone étudiée précédemment.

a) Réactions colorées se développant à 100°

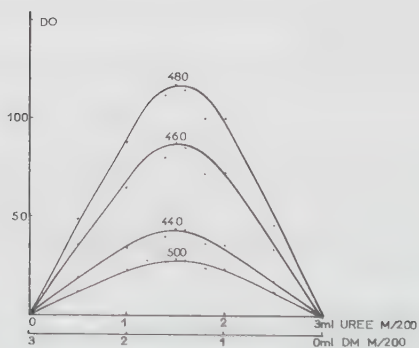
Nous avons résumé ci-dessous les conditions opératoires utilisées. Le volume réactionnel total était toujours de 6 ml et les solutions d'urée de même molarité que celles des dicétones :

- Diacétyl M/ 200, réactif arsénicosulfurique 2 ml, bain-marie bouillant 10 minutes (graphique 61)
- Diacétylmonoxime M/ 200, réactif arsénicosulfurique 2 ml, bain-marie bouillant 20 minutes (graphique 62)
- Diacétylmonoxime M/ 300, HCl 1,25 ml, bain-marie bouillant 60 minutes (graphique 63)
- Diacétylmonoxime M/ 500, PO_4H_3 2,5 ml, bain-marie bouillant 30 minutes (graphique 64)
- Diacétylmonoxime M/ 50, acide arsénique 40 g % 3 ml, bain-marie bouillant 30 minutes (graphique 65)
- Diacétyldioxime M/ 200, réactif arsénicosulfurique 3 ml, bain-marie bouillant 30 minutes (graphique 66)
- Phénylpropanedione M/ 200, réactif arsénicosulfurique 3 ml, bain-marie bouillant 60 minutes (graphique 67)
- Phénylpropanedione M/ 200, PO_4H_3 3 ml, bain-marie bouillant 60 minutes (graphique 68)
- Phénylpropanedionemonoxime M/ 200, réactif arsénicosulfurique 3 ml, bain-marie bouillant 60 minutes (graphique 69)
- Heptoxime M/ 300, PO_4H_3 4 ml, bain-marie bouillant 60 minutes (graphique 70)
- Heptoxime M/ 100, réactif arsénicosulfurique concentré 4 ml, bain-marie bouillant 30 minutes (graphique 71)

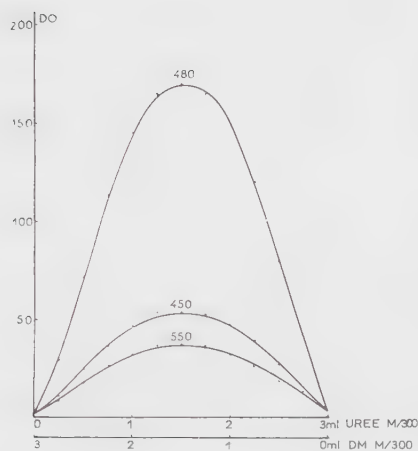
L'examen des graphiques 61 à 71 montre que le diacétyl, la diacétylmonoxime, la diacétyldioxime, la phénylpropanedione, la phénylpropanedionemonoxime et l'heptoxime donnent les colorations les plus intenses avec une quantité égale d'urée. Les complexes colorés formés correspondent donc à une proportion d'une molécule de dicétone et d'une molécule d'urée. Les monoximes et les dioximes réagissent comme les dicétones. La nature du milieu acide n'intervient pas : avec la diacétylmonoxime par exemple, les proportions trouvées sont identiques



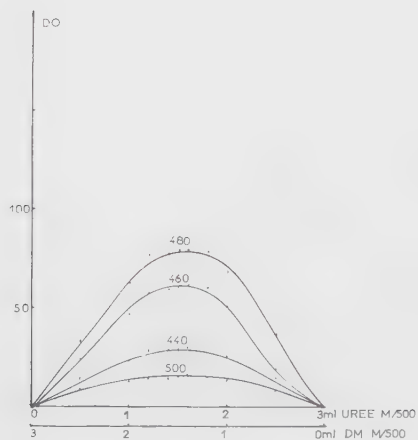
Graphique 61. Méthode de Job
Réaction colorée urée-diacétyl en milieu arsénicosulfurique



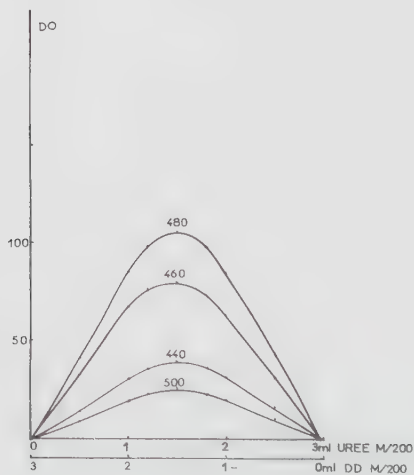
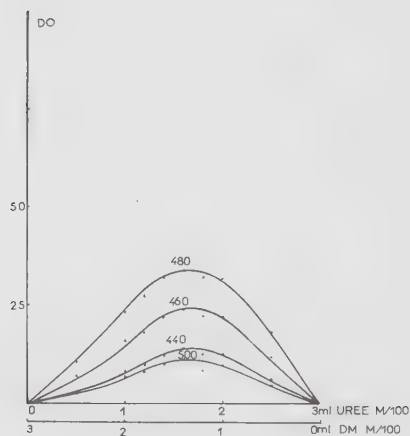
Graphique 62. Méthode de Job
Réaction colorée urée-diacétylmonoxime en milieu arsénicosulfurique

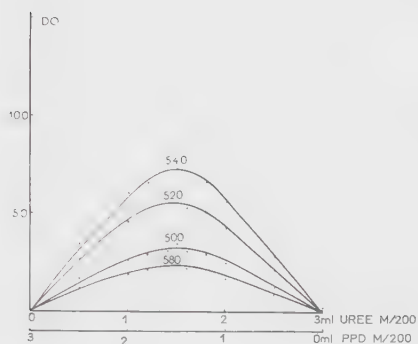


Graphique 63. Méthode de Job
 Réaction colorée urée-diacétylmonoxime en milieu chlorhydrique

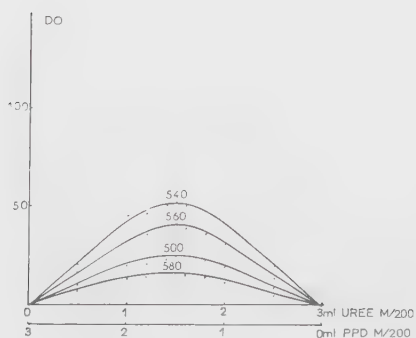


Graphique 64. Méthode de Job
 Réaction colorée urée-diacétylmonoxime en milieu phosphorique

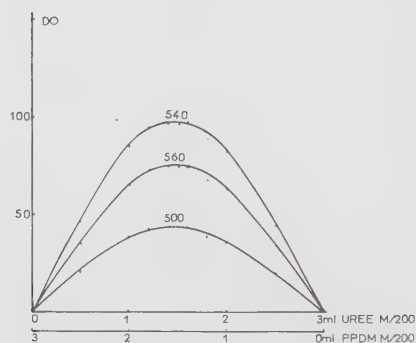




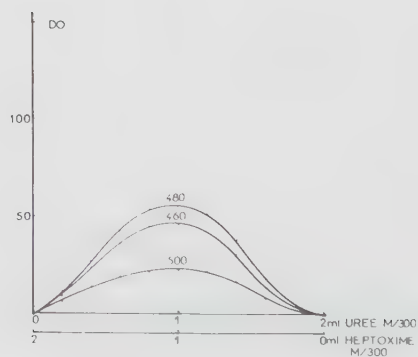
Graphique 67. Méthode de Job
 Réaction colorée urée-phénylpropanedione en milieu arsénicosulfurique



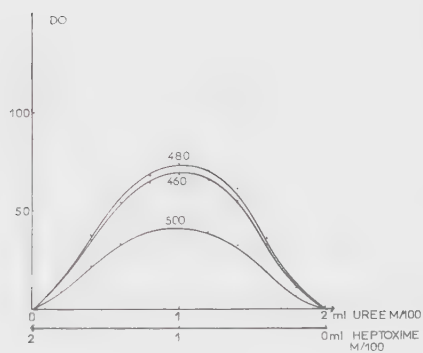
Graphique 68. Méthode de Job
 Réaction colorée urée-phénylpropanedione en milieu phosphorique



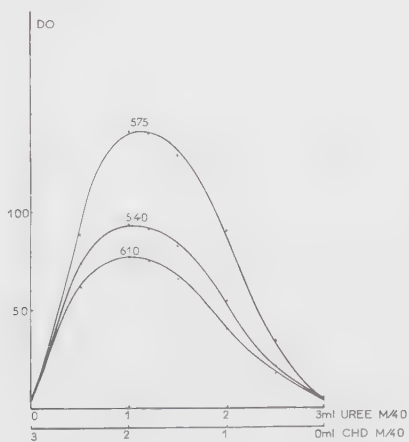
Graphique 69. Méthode de Job
 Réaction colorée urée-phénylpropanedione monoxime
 en milieu arsénicosulfurique



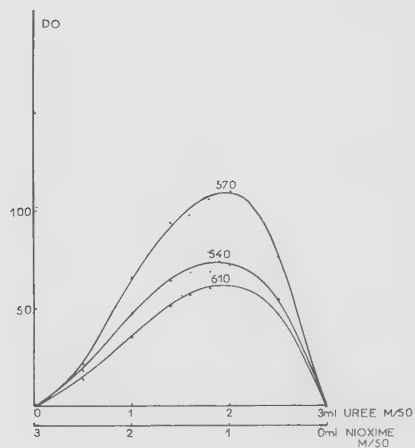
Graphique 70. Méthode de Job
 Réaction colorée urée-heptoxime en milieu phosphorique



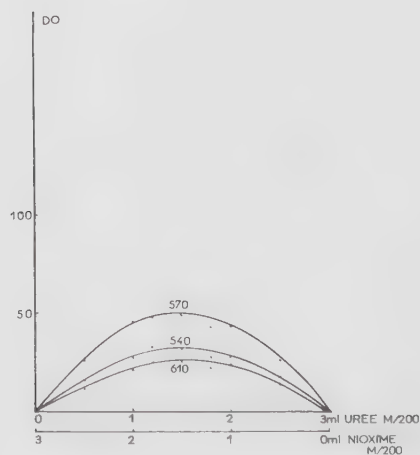
Graphique 71. Méthode de Job
Réaction colorée urée-heptoxime en milieu arsénicosulfurique



Graphique 72. Méthode de Job
Réaction colorée urée-cyclohexanedione en milieu phosphorique à 37°



Graphique 73. Méthode de Job
Réaction colorée urée-nioxime en milieu phosphorique à 37°



Graphique 74. Méthode de Job
Réaction colorée urée-nioxime en milieu chlorhydrique à 37°

en milieu phosphorique, chlorhydrique, arsénicosulfurique, arsénique (graphiques 62 à 65) ainsi qu'en milieux sulfosalicylique et trichloracétique. Les différences d'intensité des réactions colorées développées dans les milieux acides ne sont donc pas dues à des modifications de la formule des complexes colorés.

De même la nécessité d'utiliser avec certains acides des quantités supérieures de diacétylmonoxime n'a pas pour origine la formation d'autres complexes colorés.

Enfin la méthode de Job appliquée à l'heptoxime donne les mêmes résultats qu'avec les alpha-dicétones linéaires.

Toutes ces dicétones et leurs monoximes ou dioximes donnent donc des complexes colorés avec une quantité équimoléculaire d'urée.

b) Réactions colorées se développant à 37°

L'application de la méthode des variations continues de Job aux réactions colorées données par la cyclohexanedione et la nioxime a donné des résultats très variables.

Avec la cyclohexanedione il semblerait qu'une molécule d'urée se combine à deux molécules de cyclohexanedione en milieu phosphorique (graphique 72), sulfurique et arsénicosulfurique. Mais ce résultat ne correspond qu'à la plus grande fréquence des expériences car parfois nous avons des colorations les plus intenses pour 2 urée-3-cyclohexanedione, ou même avec une solution méthylrique de cyclohexanedione, 1 urée-1 cyclohexanedione.

Ce que nous pouvons exclure c'est une combinaison 2 urée-1 cyclohexanedione.

Les résultats variables obtenus ne sont pas dus à une modification de spectre, modification lente excluant toute interférence. Les complexes trouvés dans chaque cas restent valables pour les colorations violettes, bleues, vertes et jaunes successives.

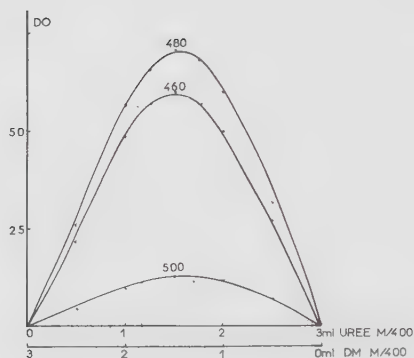
D'autre part lorsqu'à une coloration correspondent deux maximums d'absorption par exemple à 590 et 485 nm, les complexes trouvés par lecture à ces deux longueurs d'onde sont identiques.

Donc les variations observées ne sont pas dues à la réaction colorée elle-même. Il nous semble que les difficultés rencontrées proviennent essentiellement de l'instabilité de la dicétone et de sa solubilité difficile.

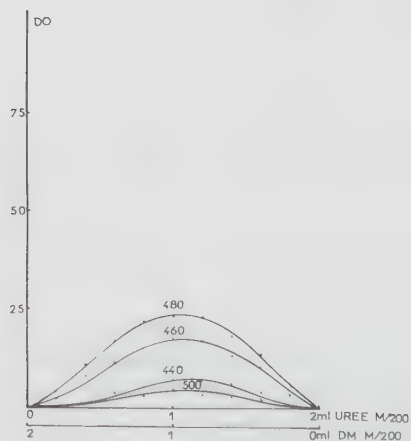
Avec la nioxime nous avons également obtenu des résultats variables suivant les milieux dans lesquels se développait la réaction colorée.

- Milieu phosphorique (3 ml) bain-marie 37° 60 minutes, solutions équimoléculaires M/50 (graphique 73)

L'intensité maxima des colorations correspond à des proportions de 2 molécules d'urée et d'une molécule de nioxime. Les résultats sont reproductibles.



Graphique 75. Méthode de Job
 Réaction urée-diacétylmonoxime en milieu phosphorique après
 addition de chloramine



Graphique 76. Méthode de Job
 Réaction urée-diacétylmonoxime en présence de sel ferrique,
 en milieu phosphorique

- Milieu chlorhydrique (1,5 ml) bain-marie 37° 120 minutes, solutions équi-moléculaires M/ 200 (graphique 74)

Avec cet acide les colorations les plus intenses sont obtenues pour des proportions équi-moléculaires d'urée et de nioxime.

Il en est de même en milieu arsénicosulfurique.

Les résultats diffèrent donc d'un milieu acide à l'autre. Mais nous avons suivi les colorations pendant leur développement ultérieur : la mesure des colorations vertes obtenues quatre heures plus tard met en évidence qu'aussi bien en milieu phosphorique qu'en milieu chlorhydrique, les complexes les plus intenses correspondent à une molécule d'urée pour une molécule de nioxime. Il y a donc modification des complexes colorés en milieu phosphorique.

Les résultats obtenus avec la nioxime diffèrent donc également de ceux de la cyclohexanedione, surtout en milieu phosphorique. Les proportions les plus favorables étaient en effet de 1-cyclohexanedione et 2-urées au lieu de 2-nioximes pour 1 urée. De plus ce rapport reste invariable pendant l'évolution des colorations avec la cyclohexanedione, alors qu'on obtient au contraire un rapport 1/1 avec la nioxime.

La méthode des variations continues de Job ne semble donc pas pouvoir donner des résultats interprétables avec la cyclohexanedione et la nioxime.

A l'origine de ces résultats, se trouve peut-être le fait que toute la nioxime ou toute la cyclohexanedione n'est pas consommée dans ces réactions colorées, ce que nous avons mis en évidence par l'examen des spectres ultra-violet après développement des réactions colorées.

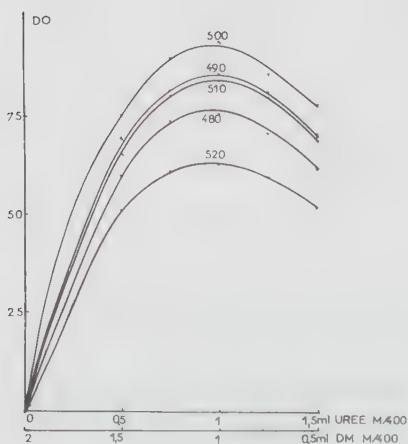
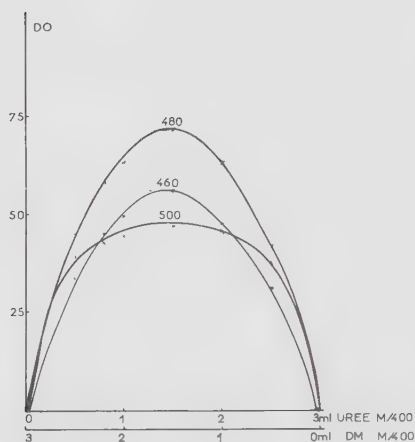
II - ETUDE EN PRESENCE DE SUBSTANCES INTERFERENTES

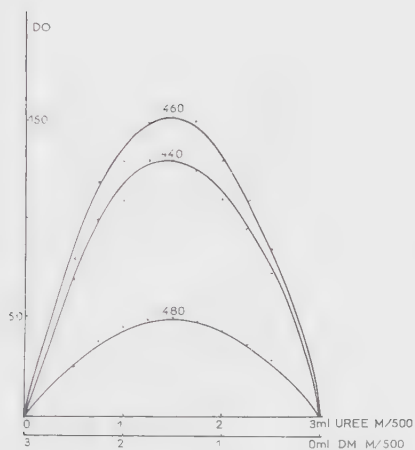
a) Avec la diacétylmonoxime

Nous avons effectué des essais par la méthode des variations continues après addition :

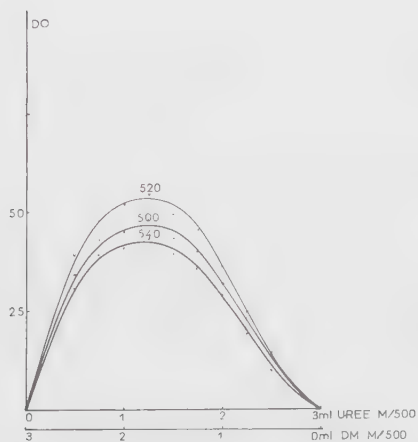
- de chloramine (0,5 ml M/ 1000) en milieu phosphorique (graphique 75)
- de fer (réactif phosphoferrique 4 ml) bain-marie bouillant 8 minutes (graphique 76)
- de tryptophane (0,5 ml M/ 2000) en milieu arsénicosulfurique 2 ml (graphique 77) et 3,5 ml (graphique 78) bain-marie bouillant 10 minutes
- de phénazone (0,5 ml M/ 10) en milieu arsénicosulfurique 2 ml, bain-marie bouillant 10 minutes (graphique 79)
- de thiosemicarbazide (0,5 ml M/ 500) en milieu arsénicosulfurique 2 ml, bain-marie bouillant 10 minutes (graphique 80).

Les colorations les plus intenses sont toujours obtenues pour une molécule d'urée et une molécule de diacétylmonoxime, (on note cependant un léger

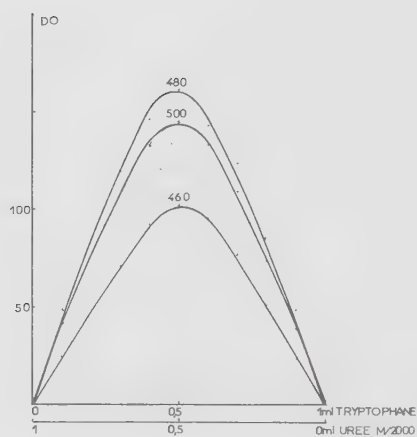




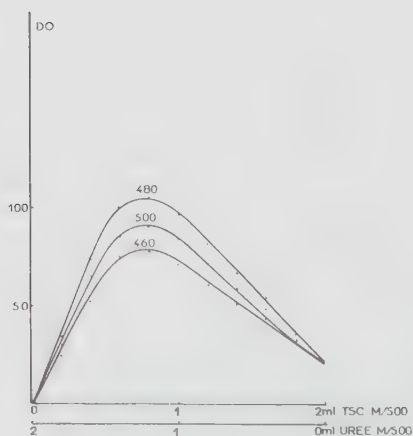
Graphique 79. Méthode de Job
 Réaction urée-diacétylmonoxime en milieu arsénicosulfurique
 en présence de phénazone



Graphique 80. Méthode de Job
 Réaction urée-diacétylmonoxime en milieu arsénicosulfurique
 en présence de thiosemicarbazide



Graphique 81. Méthode de Job
Rapports les plus favorables entre l'urée et le tryptophane



Graphique 82. Méthode de Job
Rapports les plus favorables entre l'urée et le thiosemicarbazide

déplacement avec le thiosemicarbazide). L'activité intensifiante, la modification de la cinétique des réactions colorées ou même le déplacement des spectres des colorations par addition de ces composés, ne sont donc pas dus à un changement des proportions d'urée et de dicétone entrant dans les complexes colorés.

Avec la méthode de Job, nous avons tenté de préciser les relations entre l'urée et les substances intensifiantes actives à faible concentration comme le tryptophane et le thiosemicarbazide. Nous avons fait d'abord une étude avec des proportions croissantes et décroissantes d'urée et de tryptophane (solutions M/2000). La quantité de diacétylmonoxime (1 ml M/10) restait constante (graphique 81). Les colorations les plus intenses sont obtenues pour une molécule d'urée et une molécule de tryptophane.

Avec le thiosemicarbazide et l'urée (solutions M/500) au contraire, les colorations les plus intenses sont obtenues pour une molécule de thiosemicarbazide et deux molécules d'urée (graphique 82).

Il semblerait donc que ces composés entrent dans les complexes colorés en proportions bien définies mais variables suivant la nature du composé intensifiant.

Le résultat obtenu avec le tryptophane diffère des observations visuelles de OREKHOVIC et TUSTANOVSKIJ (1949) qui avaient trouvé comme rapport le plus favorable, une molécule de tryptophane et quatre molécules d'urée (voir page).

b) Avec la nioxime

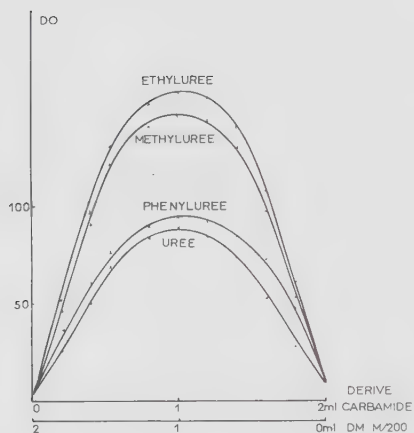
L'acétone en milieu phosphorique modifie les proportions les plus favorables d'urée et de nioxime qui passent de 2/1 à 1/1. Par contre l'addition de méthanol ou d'acide arsénique est sans influence.

III - APPLICATION DE LA METHODE DE JOB AUX DERIVES SUBSTITUES DE L'UREE

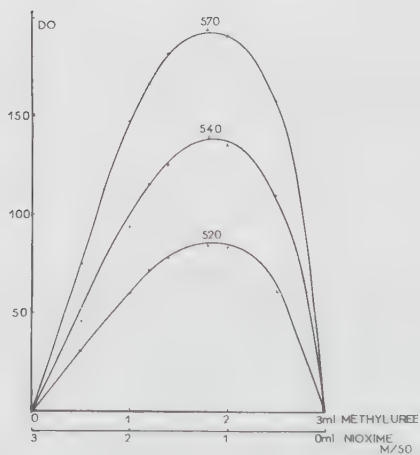
Le graphique 83 met en évidence qu'avec la diacétylmonoxime, l'urée, la méthylurée, l'éthylurée et la phénylurée, les complexes colorés se forment dans des proportions de une molécule de dérivé carbamidé pour une molécule de dicétone. Les résultats ont été retrouvés avec la phénylpropanedione et l'heptoxime.

Avec la nioxime, les dérivés monosubstitués de l'urée donnent des colorations les plus intenses pour deux molécules de composé carbamidé et une molécule de nioxime. Le graphique 84 présente à titre d'exemple les résultats obtenus avec la méthylurée (PO_4H_3 3 ml, bain-marie 37° 60 minutes).

Les dérivés monosubstitués de l'urée réagissent donc comme l'urée.



Graphique 83. Méthode de Job
Réactions diacétylmonoxime-dérivés carbamidés en milieu
arsénicosulfurique



Graphique 84. Méthode de Job
Réaction nioxime-méthylurée en milieu phosphorique

CONCLUSION

La méthode des variations continues de Job a mis en évidence qu'à une molécule d'alpha-dicétone (exception faite de la cyclohexanedione) s'unit en général une molécule d'urée ou de dérivé carbamidé.

Ces résultats permettent d'exclure différentes combinaisons présentées dans l'introduction de la Troisième Partie de ce Travail :

- formation de diuréine selon FRANCHIMONT et KLOBBIE (1888) (cas 1)
- hypothèse de PERROT et VELAY (1958) (cas 5)
- formule possible présentée (cas 6 b et c)

Les différents composés interférents ajoutés dans les milieux réactionnels ne modifient pas les proportions trouvées. Nous avons montré que le tryptophane et le thiosemicarbazide semblent entrer en proportion définie dans le complexe coloré.

CONCLUSIONS DE LA TROISIEME PARTIE

Par l'étude de la réactivité des dicétones nous avons montré que seules les alpha-dicétones donnent une réaction positive avec les dérivés carbamidés. Un groupement méthyle en alpha d'un carbonyle semble également nécessaire. Dans les conditions opératoires utilisées, les oximes s'hydrolysent et ce sont les dicétones qui réagissent avec les composés carbamidés. Le diacétyle, la phénylpropanedione et la cyclohexanedione donnent en effet des réactions colorées plus intenses et plus rapidement développées que celles des oximes, à condition d'utiliser des modalités expérimentales qui leur sont adaptées.

Par l'étude de la réactivité des dérivés substitués de l'urée, nous avons montré que lorsqu'un dérivé carbamidé autre que l'urée réagit avec une dicétone, les caractéristiques de la réaction colorée diffèrent de celle de l'urée, en particulier du point de vue intensité, spectre et cinétique. Il faut retenir également que certains composés s'hydrolysent dans le milieu acide et ce sont les produits d'hydrolyse (méthylurée pour l'acétylméthylurée, urée pour l'acide allantôïque) qui réagissent avec les alpha-dicétones.

Enfin, par la méthode des variations continues de Job, nous avons mis en évidence que l'urée, comme ses dérivés substitués formaient des complexes colorés dans lesquels le dérivé carbamidé et la dicétone (à l'exception de la cyclohexanedione et de sa dioxime) sont en quantité équimoléculaire.

Après ces essais, que deviennent les hypothèses présentées par différents auteurs et rapportées dans l'introduction de cette Troisième Partie de notre Travail (page 165).

La formation de diuréine est à exclure, d'abord parce que ce composé n'est pas coloré, ensuite parce que nous avons montré que 1 molécule d'urée s'unissait à 1 molécule dicétonique.

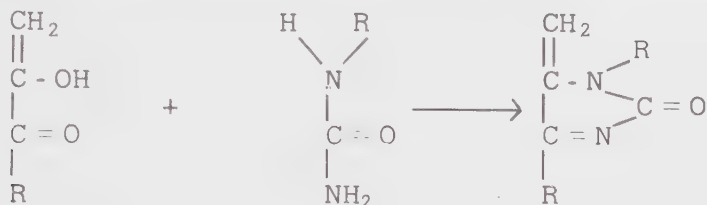
La deuxième condensation proposée par FEARON (1939) n'est pas à rejeter après nos essais. Elle rend compte de la nécessité d'un groupement méthyle en alpha d'une fonction carbonyle. Cependant la réactivité des alpha-dicétones cyclaniques semble difficile à concevoir suivant ce schéma.

Par contre, cette formule est valable pour les dérivés monosubstitués de l'urée.

Le terme de "condensation oxydative" utilisé par FEARON, semble inexact, puisque cette réaction peut se développer dans un milieu réducteur : l'acide formique permet le développement d'une coloration avec l'urée (page 26).

La combinaison proposée par DICKENMANN et coll. (1954) semble à première vue la plus probable. Mais la réactivité des dérivés monosubstitués ne

permet pas d'envisager une réaction aussi simple. Cependant si l'on fait intervenir une forme énolique des alpha-dicétones (possible grâce à la présence d'un groupement méthyle proche), les dérivés monosubstitués peuvent former une telle combinaison

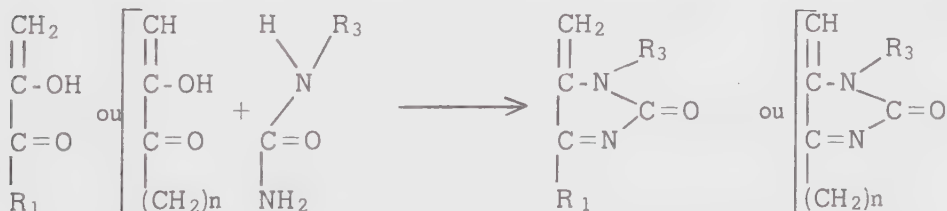


Les hypothèses de BEALE et CROFT (1961) sont simplement à rejeter car le diacétyl et les autres alpha-dicétones donnent une réaction égale sinon supérieure à celle des oximes. Les résultats inférieurs obtenus par ces auteurs avec le diacétyl, avaient probablement pour cause l'utilisation d'un produit non distillé ou des conditions opératoires adaptées à la diacétylmonoxime et non au diacétyl.

Suite à nos résultats obtenus avec la méthode des variations continues, l'hypothèse avancée par PERROT et VELAY (1958) n'est pas à envisager.

Enfin parmi les autres formules de complexes colorés qui nous semblaient possibles (page 167) seule la première peut-être retenue après nos essais.

Une condensation selon le schéma ci-dessous semble la plus probable.



QUATRIEME PARTIE

APPLICATIONS BIOLOGIQUES

Nous avons appliqué aux milieux biologiques en vue de l'analyse quantitative des dérivés carbamidés, les réactions colorées étudiées dans les Première, Deuxième et Troisième Parties de ce Travail. Nous nous sommes limités au dosage de certains composés présentant un intérêt en chimie clinique.

L'urée, chez l'homme, se trouve dans les milieux biologiques en quantité nettement supérieure à celle des autres dérivés carbamidés et il n'est pas nécessaire de rappeler l'intérêt de son dosage.

La mesure de l'activité de l'arginase (EC 3-5-3-1) enzyme scindant l'arginine en urée et ornithine, repose également sur le dosage de l'urée.

La citrulline, acide aminé N-carbamylé, existe à un faible taux dans le sang et l'urine et jusqu'à présent ses variations n'ont pas retenu l'attention des biochimistes en dehors de certaines maladies métaboliques assez rares. Mais son dosage permet de mesurer l'activité de l'ornithine-carbamyltransférase (EC 2-1-3-3).

Cette enzyme contrôle le transfert du radical carbamylé du carbamyl phosphate sur l'ornithine avec formation de citrulline. L'intérêt de l'étude de cette enzyme a pour origine sa localisation presque exclusivement hépatique.

Les pyrimidines et les purines peuvent donner après décomposition des dérivés carbamidés.

L'acide urique souvent dosé en chimie clinique est oxydé en allantoïne elle-même transformable en acide allantoïque. L'analyse colorimétrique de ces deux derniers composés pourrait éventuellement servir de terminaison à un dosage d'acide urique.

Nous présentons donc à la suite les méthodes de dosage de l'urée, de la citrulline et des produits de dégradation des bases puriques, basées sur des réactions colorées avec des alpha-dicétones.

I - LE DOSAGE DE L'UREE

Quoique de nombreux biologistes utilisent encore les méthodes de dosage par l'hypobromite, la xanthyrol (néphélométrie) ou l'uréase, les techniques colorimétriques directes semblent avoir été adoptées, même en France, par la majorité. Les réactions colorées de l'urée, d'application facile, ne sont essentiellement qu'au nombre de deux :

- coloration jaune avec le p-diméthylaminobenzaldéhyde se développant à température ordinaire. Cette réaction a souvent été adaptée ces dernières années au dosage de l'urée sanguine ou urinaire (WITH 1960, MICHON 1962, ROIJERS 1964)

- coloration jaune avec la diacétylmonoxime, plus sensible, mais se développant à température élevée. Notre étude de cette réaction colorée, ainsi que celles des autres alpha-dicétones avait toujours pour but, l'application facile à des fins quantitatives, ce qui exigeait certaines conditions :

- . développement rapide si possible à température basse, sinon à des températures facilement contrôlables et de courte durée. Pas d'affaiblissement par chauffage prolongé
- . stabilité après le développement, même à la lumière
- . reproductibilité
- . sensibilité adaptée à la concentration du composé à doser
- . simplicité
- . réactifs peu nombreux, faciles à préparer et à manipuler

Ces conditions nous ont amené à étudier précédemment d'une part les réactifs :

- solvant souhaitable
- concentration la plus favorable
- délai de conservation
- facilité d'utilisation (causticité, toxicité)
- quantité à introduire
- ordre d'introduction
- interférence des autres réactifs

et d'autre part la réaction colorée :

- spectre d'absorption et choix de la longueur d'onde
- température de développement
- vitesse de développement en fonction du temps (cinétique)
- stabilité à l'obscurité et à la lumière

Ces modalités opératoires définies, il reste à envisager les problèmes d'application aux milieux biologiques.

- préparation de l'échantillon, dialyse, défécation, passage sur résines, traitement par enzymes, etc . . .
- sensibilité de la réaction colorée adaptée au dosage
- étendue, des concentrations de dérivé carbamidé, suffisante pour doser les taux normaux et pathologiques
- préparation d'une gamme d'étalonnage
- comparaison avec des techniques existantes
- définition des valeurs normales obtenues par cette technique

Mais avant de passer aux applications, les conditions énoncées plus haut sont-elles remplies par les réactions urée-dicétone ?

Elles le sont certainement par l'ensemble des réactions étudiées mais jamais par une réaction colorée prise individuellement. C'est pourquoi nous proposons plusieurs techniques de dosage de l'urée dans les milieux biologiques.

1 - La première méthode de dosage est basée sur la réaction avec la diacétylmonoxime en milieu arsénicosulfurique : ce mélange acide est très répandu. La technique décrite correspond aux conditions les plus favorables avec ce milieu acide, qui repose sur l'effet de l'acide arsénique sur la cinétique de la réaction.

Mais l'emploi d'acide sulfurique très corrosif et d'acide arsénique très toxique sont des inconvénients que nous avons essayé d'éliminer.

2 - La méthode de dosage par la diacétylmonoxime en milieu phosphoferrique préconise l'acide phosphorique, de maniement plus facile que l'acide sulfurique et chlorhydrique. L'introduction de fer dans le milieu réactionnel permet d'éviter le développement très lent des colorations avec l'acide phosphorique.

L'atténuation relative de l'intensité des colorations permet d'augmenter l'étendue des concentrations dosables.

3 - La phénylpropanedione et sa monoxime donnent une réaction colorée beaucoup plus spécifique que la diacétylmonoxime. Une méthode avec cette dicétone est donc très utile pour le dosage de l'urée en présence de quantités importantes d'autres dérivés carbamidés biologiques. Nous décrivons donc une technique avec la phénylpropanedionemonoxime.

4 - La quatrième technique résulte de nos essais avec l'heptoxime. Son seul avantage est une bonne photostabilité. Mais nous retrouvons les inconvénients dus aux acides sulfurique et arsénique.

Ces quatre techniques nécessitent l'élimination préalable des protéines par défécation ou dialyse. Mais ce travail avait pour but à l'origine, la réalisation d'un dosage de l'urée sans défécation c'est-à-dire le développement direct de la coloration à partir du milieu biologique. Les techniques que nous décrivons à la suite sont l'aboutissement de nos tentatives de dosage de l'urée dans les milieux fortement protéiques comme le plasma sanguin.

5 - Avec chaque composé introduit dans le mélange réactionnel, pour chaque modalité opératoire nous tentions de développer la réaction colorée en présence de protéines. Nous n'en avons pas fait état jusqu'à présent car dans tous les essais, les protéines interféraient.

Ce n'est qu'après l'étude des composés intensifiants que nous avons pensé utiliser la sensibilité très grande des colorations développées en présence de ces composés. De cette manière en effet, la prise d'essai contenant l'urée est très faible, la quantité de protéines introduite simultanément l'est aussi et les protéines n'interfèrent plus.

Nos recherches ont donc abouti à ce résultat pratique souhaité : éviter la défécation préalable.

6 - Enfin la dernière technique de dosage de l'urée décrite utilise la nio-xime. Elle est plus spécialement adaptée à la mesure quantitative de l'urée urinaire. L'avantage inhérent à la réaction urée-nioxime est son développement en milieu phosphorique à 37° et l'inconvénient dû au manque de sensibilité n'est pas gênant pour un milieu riche en urée comme l'urine.

Suite aux résultats des premières parties de ce Travail, les techniques présentées préconisent en général le développement des colorations dans 6 ml de volume total. Mais pour l'utilisation pratique, il est possible de diminuer de moitié toutes les proportions de réactifs puisque 3 ml de volume total sont suffisants pour effectuer des lectures photométriques.

A - DOSAGES DE L'UREE APRES DEFECATION (OU DIALYSE)

Les méthodes habituelles de défécation ont été préconisées pour éliminer les protéines des milieux biologiques :

- défécation trichloracétique (JANCIC 1952 - CARAWAY et FANGER 1956 - KNIGHTS 1957 - IUCHI 1958 - ANDERSEN 1959 - KITAMURA et IUCHI 1959 - FAUVERT et HARTMANN 1959 et 1961 - NOVAK 1961 - LECOQ 1962 - O'BRIEN 1962 - CERIOTTI et SPANDRIO 1963 - MANOVA 1963 - BRUYET 1965 - HARVEY et RICHARDS 1965 - D.J. MARSCH 1965 - HAURY 1965 - JEROME 1966 - CHEMETRON CHIMICA 1966 - COTTE 1966)

- défécation zincique : $\text{SO}_4\text{Zn} + \text{NaOH}$ (HALVORSON et SCHULTZE 1948 - WHEATLEY 1948 - VELAY 1957 - GIRARD et DREUX 1958 - SARDOU 1958 - HOLDEN 1959 - BALDI 1960 - FORSELL et PALVA 1960 - BEALE et CROFT 1961 - DEVAUX 1962 - DUDEK 1966)

- défécation cadmique : $\text{SO}_4\text{Zn} + \text{Baryte}$ (ARCHIBALD 1945, MURAYAMA 1952 - FRIEDMANN 1953 - DICKENMANN 1954 - CERIOTTI et SPANDRIO 1963)

- défécation tungstique : (BARKER 1942 - ORMSBY 1942 - KAWERAU 1946 - NATELSON 1951 - JANCIC 1952 - CARAWAY et FANGER 1955 - GARCIA CANTURRI 1958 - RICHTER et LAPOINTE 1959 - COULOMBE et FAVREAU 1963 - DAMM et KING 1965 - HYCEL 1966)

MOMOSE et coll. (1965) emploient l'alun de fer au lieu de SO_4H_2 pour former l'acide tungstique.

Il faut noter qu'ARCHIBALD (1945) et FORSELL et PALVA (1960) ont déconseillé la défécation tungstique et que BARKER (1942) et KAWERAU (1946) ont obtenu des résultats plus faibles après défécation zincique ou cadmique.

Les méthodes automatiques de dosage séparent les protéines par dialyse, procédé qu'avait également préconisé ARCHIBALD.

Nous avons utilisé les trois types de défécation : trichloracétique, zincique et tungstique, et la dialyse avec un appareil automatique.

Nous avons tenté comme ABELIN (1940) d'utiliser l'acidité du réactif déféquant pour développer la réaction colorée : les essais effectués avec les acides trichloracétique, perchlorique, sulfosalicylique et paratoluènesulfonique ne furent pas satisfaisants car les concentrations les plus favorables pour le développement de la réaction colorée n'étaient pas atteintes avec ces acides utilisés comme déféquants.

I - DOSAGE DE L'UREE PAR LA DIACETYLMONOXIME EN MILIEU ARSENICO-SULFURIQUE

L'utilisation d'un réactif arsénicosulfurique a été préconisée par FRIEDMANN (1953). Il fut introduit en France par SARDOU (1958). C'est également

avec un tel réactif que SKEGGS (1957) et MARSH et coll. (1957) mirent au point le dosage de l'urée dans un appareil automatique, première méthode de ce type. A la suite du tableau synoptique (page 14), cette méthode nous a servi d'exemple pour présenter ces réactions colorées (page 22).

La méthode décrite ci-dessous est basée sur les résultats présentés dans le chapitre premier de la Première Partie. L'addition d'acide arsénique permet un développement plus rapide d'une réaction colorée moins intense.

REACTIFS

- I - Solution aqueuse de sulfate de zinc à 10 g %
- II - NaOH 0,5 N
- III - Réactif arsénicosulfurique dilué

Acide sulfurique 50 ml
Eau distillée 150 ml

Mélanger avec précaution. Laisser refroidir partiellement et ajouter :

AsO₄ H₃ 10 g

Filtrer sur laine de verre et décantier si nécessaire.

- IV - Solution aqueuse de diacétylmonoxime à 1 g %
- V - Solution stock d'urée à 1 g pour 1000
- VI - Solutions diluées d'urée à 0,05 et 0,1 pour 1000

MODE OPERATOIRE

1) Défécation

- Eau distillée 7 ml
- Sang 1 ml
- Sulfate de zinc à 10 % 1 ml
- NaOH 0,5 N 1 ml

Agiter après chaque addition de réactif.
Repos 5 minutes. Centrifuger ou filtrer.

...

2) Coloration et témoins journaliers

Tubes		Blanc	T ₁	T ₂	Dosage
Eau distillée	ml	1			
Solution d'urée 0,05 pour 1000	ml		1		
Solution d'urée 0,1 pour 1000	ml			1	
Défécât	ml				1
Réactif arsénicosulfurique dilué	ml	4	4	4	4
Diacétylmonoxime (solution IV)	ml	1	1	1	1

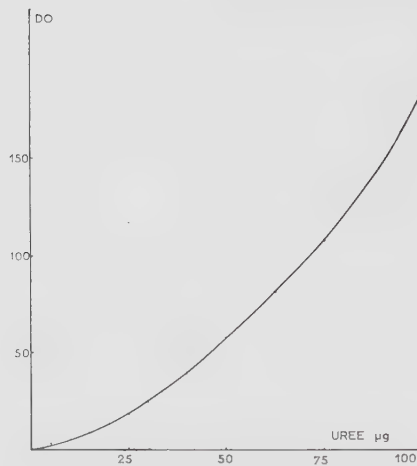
Agiter. Mettre immédiatement au bain-marie bouillant 20 minutes. Refroidir 10 minutes. Lecture au Spectrophotomètre à 480 nm ou au photomètre avec écran bleu (par exemple V.B.C. - cellule A - écrans 0/5 - cuve de 1 cm)

GAMME D'ETALONNAGE

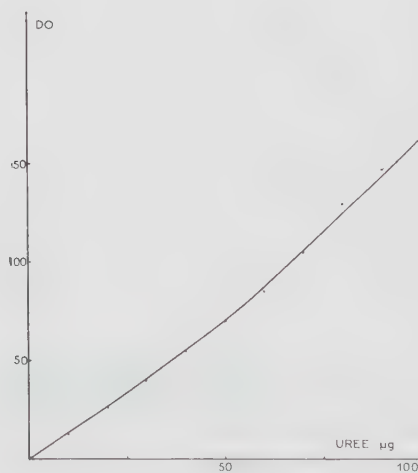
Solution d'urée à 0,1 pour 1000	ml	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Réactif arsénicosulfurique dilué	ml	4	4	4	4	4	4
Diacétylmonoxime (solution IV)	ml	1	1	1	1	1	1
Eau distillée	ml	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Développer les colorations comme précédemment							
Urémie en g pour 1000	ml	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1

Le graphique 85 présente la courbe d'étalonnage obtenue.

La diacétylmonoxime donne des résultats du même ordre que les méthodes à l'uréase et inférieurs à ceux donnés par l'hypobromite.



Graphique 85. Dosage de l'urée par la diacétylmonoxime en milieu arsénicosulfurique. Courbe d'étalonnage (spectrophotomètre Safas 480 nm)



Graphique 86. Dosage de l'urée par la diacétylmonoxime en milieu phosphoferrique. Courbe d'étalonnage (spectrophotomètre Safas 480 nm)

La forme en "S" de cette courbe d'étalonnage ne s'améliore ni par l'allongement du temps de chauffage, ni par l'augmentation de la concentration en réactif arsénicosulfurique.

II - DOSAGE DE L'UREE PAR LA DIACETYLMOXIME EN MILIEU PHOSPHOFERRIQUE

L'acide phosphorique, de manipulation plus aisée que l'acide sulfurique ne permet qu'un développement lent des colorations. Les sels ferriques modifient profondément la cinétique de cette réaction colorée (accélération puis stabilisation) et permettent un développement rapide et complet.

Ces résultats exposés dans la Première Partie de ce Travail (chapitre III - B -) nous ont permis de mettre au point la technique suivante.

REACTIFS

I - Solution aqueuse d'acide trichloracétique à 60 g pour 1000

II - Solution de diacétylmonoxime contenant de l'urée

Diacétylmonoxime	1 g
Solution d'urée 1 g pour 1000	4 ml
Eau distillée	q.s.p. 100 ml

III - Réactif phosphoferrique

Chlorure ferrique	4 g
Eau distillée	75 ml
Acide phosphorique	125 ml

IV - Solution stock d'urée à 1 pour 1000. Conserver à +4°

V - Solutions standards d'urée à 0,05, 0,1 et 0,2 pour 1000

MODE OPERATOIRE

1) Défécation

	Méthode habituelle	Microméthode
- Eau distillée	ml 2	0,4
- Plasma (ou sérum ou sang total) ..	ml 0,5	0,1
- C Cl ₃ - COOH 60 pour 1000	ml 2,5	0,5

Mélanger. Repos quelques minutes. Centrifuger.

...

2) Colorations et témoins journaliers

Tubes		Blanc	T ₁ 0,5p.1000	T ₂ 1 p. 1000	Dosage
Eau distillée	ml	0,5			
Solution d'urée 0,05 pour 1000	ml		0,5		
Solution d'urée 0,1 pour 1000	ml			0,5	
Défécât	ml				0,5
Réactif phosphoferrique	ml	2	2	2	2
Diacétylmonoxime uréique (réactif II)	ml	0,5	0,5	0,5	0,5

Agiter soigneusement et dès l'addition du dernier réactif mettre au bain-marie bouillant 8 minutes. Refroidir 5 minutes. Lecture au Spectrophotomètre à 480 nm - ou au photomètre écran bleu (par exemple Vernes-Bricq et Constant - cellule à antimoine - écrans 0/5 - cuve de 1 cm) en faisant le zéro de l'appareil sur le " blanc ".

GAMME D'ETALLONAGE

Solution d'urée à 0,2 pour 1000	ml	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Réactif phosphoferrique	ml	2	2	2	2	2	2
Diacétylmonoxime uréique (réactif II)	ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Eau distillée	ml	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Développer les colorations comme précédemment							
Urémie g pour 1000		0	0,4	0,8	1,20	1,60	2

Faire le zéro de l'appareil sur le premier tube (qui est coloré également) le graphique 86 présente le tracé obtenu.

Avec cette technique, le début de la courbe d'étalonnage manque de précision. Pour remédier à cet état, nous introduisons une certaine quantité d'urée dans la solution de diacétylmonoxime. L'urée ne modifie pas la stabilité du réactif que l'on doit toujours conserver en flacon brun.

Comparaisons des défécations

Nous avons effectué une étude comparative des défécations zincique et trichloracétique. Le graphique 87 donne en coordonnées, les résultats du dosage de l'urée pour un même sang et deux techniques de défécation. La bissectrice de cette figure représente le lieu géométrique des sangs pour lesquels les deux défécations fournissent des résultats identiques.

Les résultats sont strictement superposables sauf pour certaines colorations obtenues seulement avec la défécation zincique : colorations roses déjà signalées par GIRARD et DREUX (1959) et nous-mêmes (1960). Cette coloration rose doit être due à la présence de protéines mal éliminées. Elle s'obtient en général après défécation zincique du sang total et rarement lorsqu'on utilise le plasma ou le sérum. Jamais nous n'avons obtenu de coloration rose avec la défécation trichloracétique.

Comparaisons avec un réactif arsénicosulfurique

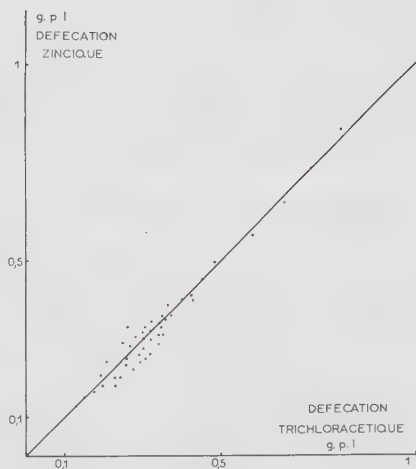
Les résultats obtenus avec le réactif phosphoferrique sont plus élevés que ceux obtenus avec le réactif arsénicosulfurique. La différence est de l'ordre de 5 %. Nous avons vérifié ces observations avec un autoanalyseur (VIGNERON Cl 1966).

Les avantages de cette méthode par rapport aux méthodes utilisant un réactif arsénicosulfurique sont :

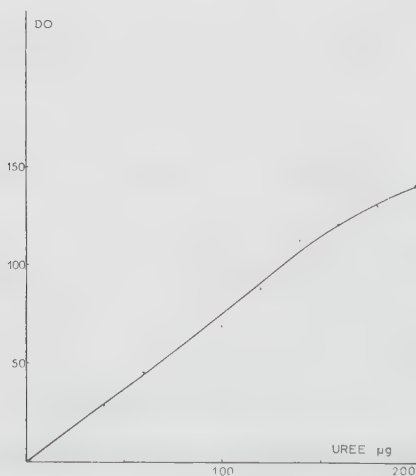
- réactifs moins caustiques et moins toxiques
- temps de chauffage court et bien défini mettant à l'abri d'erreur de minutage
- sensibilité adaptée à la mesure des urémies jusqu'à 2 g pour 1000 tout en permettant l'utilisation en microméthode
- meilleure stabilité et moins grande photosensibilité.

III - DOSAGE DE L'UREE PAR LA PHENYLPROPANEDIONEMONOXIME EN MILIEU PHOSPHORIQUE

La réaction colorée urée-phénylpropanedionemonoxime est très lente à se développer. Tous les essais effectués pour améliorer cette cinétique par addition des différents composés actifs avec la diacétylmonoxime (sel métallique, acide arsénique, thiosemicarbazide, phénazone . . .) n'ont donné que des résultats partiels : nette intensification sans modification importante de la cinétique.



Graphique 87. Dosage de l'urée sanguine par la diacétylmonoxime en milieu phosphoferrique. Comparaisons des défécations zincique et trichloracétique



Graphique 88. Dosage de l'urée par la phénylpropanedionemonoxime en milieu phosphorique. Courbe d'étalonnage (spectrophotomètre Safas 540 nm)

Seules les protéines peuvent accélérer le développement de cette réaction (SIEST G 1961, TIMMERMANS 1962). Mais les inconvénients pratiques de l'utilisation de solutions protéiques, en particulier leur instabilité, nous ont fait rejeter cette modalité opératoire. Nous avons donc simplement utilisé l'acide phosphorique pour acidifier le milieu (voir Première Partie de ce Travail, chapitre VI).

REACTIFS

- I - Solution aqueuse de sulfate de zinc à 10 g %
- II - NaOH 0,5 N
- III - Solution de phénylpropanedionemonoxime (alpha-isonitrosopropiophénone) à 0,4 g pour 100 ml dans éthanol à 96°
- IV - Réactif phosphorique

PO₄H₃ R-P (85 %) 350 ml
 Eau distillée 100 ml

- V - Solution stock d'urée à 1 g pour 1000
- VI - Solutions d'urée à 0,05, 0,1 et 0,2 pour 1000

MODE OPERATOIRE

1) Défécation

Eau distillée 7 ml
 Sang 1 ml
 Sulfate de zinc à 10 % 1 ml
 NaOH 0,5 N 1 ml

Agiter, après addition de réactif
 Attendre 5 minutes. Centrifuger.

2) Développement de la coloration

Défécate 1 ml
 Réactif phosphorique 4,5 ml
 Solution de phénylpropanedionemonoxime
 (réactif III) 0,5 ml

Développer simultanément les colorations de deux témoins (solutions d'urée à 0,05 et 0,1 pour 1000)
 Bain-marie bouillant 60 minutes (à l'abri de la lumière)
 Refroidir 10 minutes
 Lecture au spectrophotomètre à 540 nm ou au photomètre, écran vert.

...

GAMME D'ETALONNAGE

Solutions d'urée à 0,2 g pour 1000	ml	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Eau distillée	ml	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0

Continuer comme pour le dosage

Le graphique 88 présente la courbe d'étalonnage obtenue.

Cette réaction colorée peu utilisable pour le dosage habituel de l'urée sanguine en biologie clinique, présente un intérêt particulier pour le dosage de l'urée en présence d'autres dérivés carbamidés.

Cette réaction est en effet plus spécifique de l'urée (voir chapitre IV, Deuxième Partie de ce Travail). L'addition de composés intensifiants lui fait perdre cette qualité.

IV - DOSAGE DE L'UREE PAR L'HEPTOXIME

La qualité essentielle de la réaction urée-heptoxime est son excellente photostabilité.

C'est pourquoi nous décrivons ci-dessous une technique de dosage basée sur cette coloration, quoique nécessitant l'utilisation d'un réactif arsénicosulfurique concentré.

REACTIFS

- I - Solution aqueuse de sulfate de zinc 10 g %
- II - NaOH 0,5 N
- III - Réactif arsénicosulfurique concentré

Acide sulfurique 50 ml
Eau distillée 50 ml

Mélanger avec les précautions d'usage. Laisser refroidir partiellement et ajouter :

AsO₄ H₃ 25 g

- IV - Solution aqueuse d'heptoxime à 0,4 pour 100 ml (chauffer légèrement pour dissoudre)
- V - Solution stock d'urée à 1 g pour 1000
- VI - Solution diluée à 0,1, 0,2 et 0,4 g pour 1000

MODE OPERATOIRE

1) Défécation

- Eau distillée 2 ml
- Sang ou sérum 1 ml
- Sulfate de zinc à 10 % 1 ml

Mélanger

- NaOH 0,5 N 1 ml

Mélanger. Repos 5 minutes. Centrifuger.

2) Réactions colorées

- Défécate ou solutions diluées d'urée 1 ml
- Réactif arsénicosulfurique concentré 4 ml
- Heptoxime (réactif IV) 1 ml

Bain-marie bouillant 30 minutes

Refroidir 10 minutes.

Lecture au Spectrophotomètre à 480 nm ou au photomètre écran bleu (par exemple photomètre Vernes-Bricq et Constant - cuve de 2 cm - écrans 0/5 - cellule à antimoine).

GAMME D'E TALONNAGE

Solution d'urée à 0,4 g pour 1000	ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée	ml	1	0,9	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Réactif arsénicosulfurique	ml	4	4	4	4	4	4	4
Heptoxime (réactif IV)	ml	1	1	1	1	1	1	1
Continuer comme le dosage								
Urémies en g pour 1000	ml	0	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2

Faire le zéro de l'appareil sur le premier tube (en général légèrement teinté).

Le graphique 89 montre les courbes obtenues. Pour remédier au manque de sensibilité pour les faibles concentrations d'urée, on peut ajouter au réactif à l'heptoxime une faible quantité d'urée (voir technique avec le réactif phosphoferrique). Il est possible également de prolonger cette courbe d'étalonnage jusqu'à 5 g pour 1000 (lecture en cuve de 1 cm) avec une sensibilité satisfaisante.

Cette possibilité, ajoutée à l'excellente photostabilité de cette réaction colorée, peut être un argument pour l'utilisation de cette technique.

Nous avons vérifié que les résultats obtenus étaient identiques à ceux donnés par la diacétylmonoxime.

Ces méthodes de dosage de l'urée après défécation sont applicables à la mesure de l'activité de l'arginase (EC 3-5-3-1). C'est habituellement la méthode d'ARCHIBALD avec la phénylpropanedionemonoxime qui est utilisée (VAN SLYKE et ARCHIBALD 1946, FOLLEY et GREENBAUM 1948, MANNING et GRISOLLIA 1957, BROWN 1966).

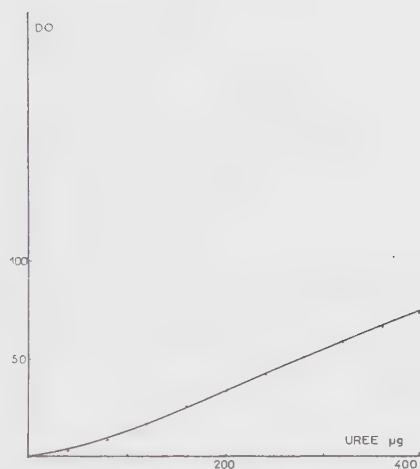
Mais CORTINA et PESTANA (1966) et ILLNEROVA (1966) ont utilisé respectivement les méthodes d'ORMSBY (1942) et de CARAWAY et FANGER (1956).

Il semble donc qu'aussi bien la diacétylmonoxime que la phénylpropanedionemonoxime sont valables pour mesurer l'urée provenant de la dégradation de l'arginine par l'arginase. Mais certains composés nécessaires à l'étude de cette activité enzymatique interfèrent : arginine (VAN SLYKE et ARCHIBALD 1946, FOLLEY et GREENBAUM 1948), manganèse (FOLLEY et GREENBAUM 1948), sucrose (MORA et coll. 1965). Il est donc nécessaire d'introduire ces composés dans les témoins des dosages. LAVAL (1961) a d'autre part mis en évidence de nombreux composés inhibiteurs ou activateurs de l'enzyme.

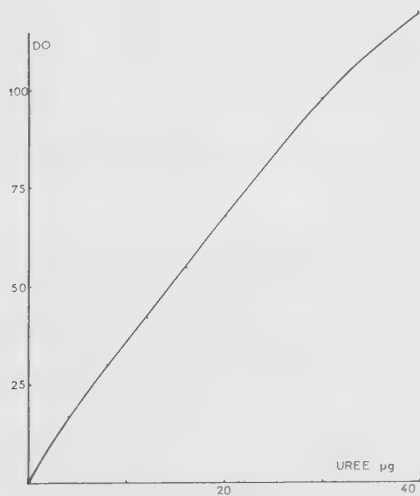
L'étude de l'arginase, en particulier celle du sérum, a été développée en France, par VINCENT et coll. (1941, 1943, 1947, 1960 et 1963). L'intérêt de la mesure de l'activité sérique semble limitée, en particulier, par la localisation multiple de cette enzyme (foie, rein, placenta, cerveau, érythrocytes, etc ...).

Son augmentation dans le sérum n'est donc pas spécifique.

Un intérêt nouveau se précisera peut-être pour le dosage de l'arginase des hématies. Le taux de cette enzyme dans les globules rouges augmente dans certaines anémies (VINCENT et coll. 1963, DARGEL 1966).



Graphique 89. Dosage de l'urée par l'heptoxime en milieu arsénicosulfurique. Courbe d'étalonnage (spectrophotomètre Safas 480 nm)



Graphique 90. Dosage de l'urée par la diacétylmonoxime en présence de thiosemicarbazide. Courbe d'étalonnage (spectrophotomètre Safas 520 nm)

B - DOSAGES DE L'UREE SANGUINE SANS DEFECATION PREALABLE

Un des buts de ce Travail était, à l'origine, la réalisation d'un dosage rapide de l'urée sans éliminer les protéines.

Tout au long de notre étude des réactions colorées nous avons étudié l'interférence des protéines. Cette interférence peut se manifester de plusieurs façons :

- elles donnent une coloration par elles-mêmes avec les acides en particulier en milieu sulfurique de concentration suffisamment élevée (carbonisation)
- elles réagissent avec les dicétones en milieu acide : les protéines développent une coloration rose avec la diacétylmonoxime et une coloration violette avec la phénylpropanedionemonoxime
- elles peuvent avoir une action inhibitrice par exemple pour la réaction urée-nioxime
- elles sont enfin capables de modifier les caractéristiques des réactions colorées des dérivés carbamidés : modification de spectre ou de cinétique. Alors qu'elles-mêmes ne donnent pas de réaction colorée, l'addition de protéines dans le milieu réactionnel contenant l'urée, la diacétylmonoxime et l'acide phosphorique, fait passer la coloration du jaune au rose. De même nous avons mis en évidence en 1961, l'effet des protéines sur la cinétique de la réaction urée-phénylpropanedionemonoxime. L'addition d'une grande quantité de protéines de sérum (ou de sérum-albumine) permet le développement plus rapide de cette coloration. Nous avons longtemps pensé utiliser cette propriété pour doser l'urée sans défécation. Mais il était nécessaire d'ajouter une quantité de protéines supérieure à celle existant dans le plasma ou le sérum et les solutions protéiques étaient de conservation difficile.

C'est pourquoi l'utilisation des protéines ne nous a pas semblé mériter une application plus étendue.

Nous avons réussi à éviter la défécation, pour le dosage de l'urée dans le sérum ou le plasma en utilisant une réaction colorée très sensible, ce qui permet une diminution de la prise d'essai d'urée et diminue donc simultanément la quantité de protéines introduites. Ces protéines sont solubles dans le milieu acide. L'utilisation de sang total est possible mais l'hémoglobine donne en milieu acide une légère coloration brune parasite qu'il faut soustraire de la coloration globale.

Pour la mise au point de cette méthode il fallait faire d'abord un choix entre deux milieux acides : phosphorique ou arsénicosulfurique. Le premier convenait bien pour solubiliser plus facilement les protéines mais le second permettait le développement plus rapide d'une réaction plus intense. Nous avons donc retenu le réactif arsénicosulfurique. Nous décrivons deux techniques comportant l'utilisation comme composés intensifiants, du thiosemicarbazide et de la phénazone.

I - DOSAGE DE L'UREE SANS DEFECATION PAR LA DIACETYLMONOXIME EN PRESENCE DE THIOSEMICARBAZIDE

REACTIFS

I - Solution aqueuse de thiosemicarbazide M/ 500 (0,182 g pour 1000)

II - Réactif arsénicosulfurique

- SO_4H_2 R-P 50 ml

- Eau distillée 50 ml

Mélanger avec précaution. Laisser refroidir partiellement.

Ajouter :

- AsO_4H_3 10 g

Décanner si nécessaire.

III - Solution aqueuse de diacétylmonoxime à 1 g %

IV - Solutions d'urée à 0,5, 1 et 2 g pour 1000

MODE OPERATOIRE en ultramicrométhode

- Eau distillée 2,5 ml

- Sérum, plasma ou solution d'urée 10 μl

Mélanger soigneusement

- Réactif arsénicosulfurique 2 ml

- Thiosemicarbazide (réactif I) 0,5 ml

- Diacétylmonoxime (réactif III) 1 ml

Mélanger. Mettre au bain-marie bouillant 10 minutes.

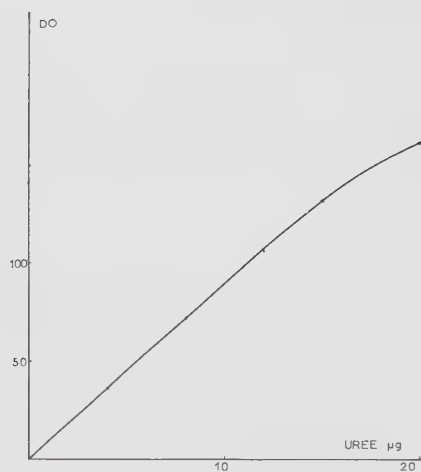
Refroidir 10 minutes.

Lecture au spectrophomètre à 520 nm.

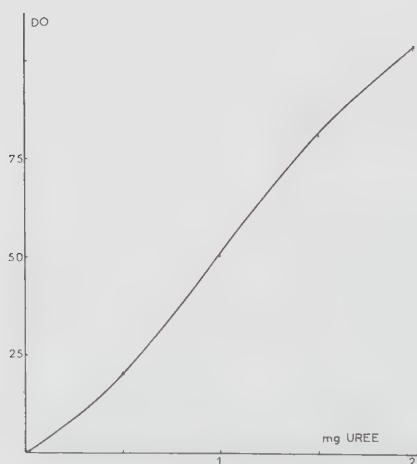
GAMME D'ETALONNAGE

Pipetter avec la micropipette de 10 μl utilisée pour les dosages, des solutions de concentration croissante en urée de 0,2 à 2 g pour 1000. Le graphique 90 présente la courbe d'étalonnage obtenue.

...



Graphique 91. Dosage de l'urée par la diacétylmonoxime en présence de phénazone. Courbe d'étalonnage (spectrophotomètre Safas 460 nm)



Graphique 92. Dosage de l'urée par la nioxime en milieu phosphorique à 37°. Courbe d'étalonnage (spectrophotomètre Safas 575 nm)

II - DOSAGE DE L'UREE SANS DEFECATION PAR LA DIACETYLMOXIME EN PRESENCE DE PHENAZONE

REACTIFS

I - Solution aqueuse de phénazone M/10 (18,8 g pour 1000)

II - Réactif arsénicosulfurique

- $\text{SO}_4 \text{H}_2$ R-P..... 50 ml

- Eau distillée 50 ml

Mélanger avec précaution. Laisser refroidir partiellement.

Ajouter :

- AsO_4H_3 10 g

Décanner si nécessaire

III - Solutions aqueuse de diacétylmonoxime à 1 g %

IV - Solutions d'urée à 0,5, 1 et 2 g pour 1000

MODE OPERATOIRE en ultra-microméthode

- Eau distillée 2,5 ml

- Sérum, plasma ou solution d'urée 5 μl

Mélanger soigneusement

- Réactif arsénicosulfurique 2 ml

- Phénazone (réactif I) 0,5 ml

- Diacétylmonoxime (réactif III) 1 ml

Mélanger. Mettre au bain-marie bouillant 20 minutes. Refroidir 10 minutes.

Lecture au spectrophotomètre à 460 nm.

GAMME D'ETALONNAGE

Pipetter avec la micropipette de 5 μl utilisée pour les dosages, des solutions de concentration croissante en urée de 0,2 à 2 g pour 1000. Le graphique 91 présente la courbe d'étalonnage obtenue dont le début est linéaire.

Il est évident que ces deux techniques peuvent être utilisées sans micropipettes en effectuant des dilutions au centième du sérum ou du plasma et en reprenant 1 ml ou 0,5 ml suivant les techniques.

C - DOSAGE DE L'UREE URINAIRE PAR LA NIOXIME

La faible sensibilité de la réaction urée-nioxime nous a fait écarter son application au dosage de l'urée sanguine, car il faudrait utiliser une quantité souvent trop importante de matériel biologique (1 ou 2 ml de défécât trichloracétique au demi). Par contre cette réaction s'applique facilement au dosage de l'urée urinaire. Des réactifs peu nombreux, faciles à préparer et à manipuler, et une coloration se développant à 37° sont des avantages certains.

REACTIFS

I - Acide phosphorique R-P

II - Solution aqueuse de nioxime M/ 25

- Nioxime 0,568 g
- Eau distillée q.s.p. 100 ml

Dissoudre à l'aide d'un agitateur magnétique en chauffant légèrement

III - Solution d'urée à 2 g pour 1000

MODE OPERATOIRE

		Blanc	T ₁	T ₂	Urine
Urine diluée au 1/10	ml				$\frac{1}{(ou\ 0,5)}$
Solution d'urée 2 pour 1000	ml		0,5	1	
Acide phosphorique	ml	3	3	3	3
Nioxime (réactif II)	ml	1	1	1	1
Eau distillée	ml	2	1,5	1	$\frac{1}{(ou\ 1,5)}$

Agiter. Mettre au bain-marie à 37° : 60 minutes (ou 45° : 30 minutes). Refroidir 10 minutes. Lecture au spectrophomètre à 575nm ou au photomètre avec un écran orangé.

...

GAMME D'ETALONNAGE

Solution d'urée à 2 g pour 1000	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2
PO ₄ H ₃	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Nioxime (réactif II)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Eau distillée	2	1,75	1,5	1,25	1	0,75	0,5	0,25	0

Continuer comme pour le dosage. Le graphique 92 représente la courbe d'étalonnage obtenue.

DISCUSSION

Reproductibilité

La reproductibilité de cette technique est bonne. Des vérifications journalières ont montré des écarts de l'ordre de 5 %. Des courbes d'étalonnage effectuées à deux ans d'intervalle par deux manipulateurs différents sont exactement superposables.

Stabilité des colorations

La coloration violette continue lentement à évoluer. Cependant la stabilité est suffisante pour la pratique courante (30 minutes). Cette réaction colorée reste photosensible. Mais elle n'est pas influencée par la lumière normale du jour à l'intérieur d'un laboratoire. Il faut seulement éviter les rayons directs du soleil ou une trop grande clarté.

Spécificité

Nous avons vérifié que les urines traitées par l'uréase ne donnaient plus de colorations. De même, l'addition d'urine traitée par l'uréase ne modifie ni l'intensité, ni la cinétique urée-nioxime. Les composés donc présents en plus de l'urée ne sont pas gênants.

Les conservateurs habituellement utilisés pour les urines (merseptyl toluène, thymol, cyanure de mercure) n'interfèrent pas dans le dosage.

La créatinine, l'acide urique, les phosphates, les protéines, le glucose ne donnent pas de réaction et ne modifient pas les caractères de la réaction colorée.

La phénolsulfonephtaléine développe une coloration orangée en milieu phosphorique qui se superpose à celle du complexe coloré urée-nioxime. Il faut dans ce cas déduire l'absorption due à la coloration parasite, absorption très faible à la longueur d'onde utilisée pour la réaction de l'urée.

Comparaison avec d'autres méthodes

Dans le tableau ci-après, nous avons relevé les valeurs d'une série d'urée urinaire réalisés par trois méthodes de dosage.

Nous voyons que les résultats obtenus avec la nioxime sont en général du même ordre que ceux donnés par la diacétylmonoxime, et souvent plus faibles que ceux avec l'hypobromite. Cependant, il y a parfois des résultats plus discordants, en particulier avec la diacétylmonoxime.

En effet, la réaction colorée urée-diacétylmonoxime est plus sensible à la présence d'autres dérivés carbamidés ou à d'autres composés (tel que le tryptophane) susceptibles de modifier les caractéristiques de la coloration. La réaction urée-nioxime est donc plus spécifique.

VALEURS DE L'UREE URINAIRE DOSEE PAR LA NIOXIME,
LA DIACETYLMONOXIME ET L'HYPOBROMITE (après défécation)

Numéros	Nioxime	Diacétylmonoxime	Hypobromite
1	20,5	20,6	21,5
2	23	23,4	26,5
3	22	22,8	25,7
4	12,8	12,7	14,25
5	23	23,4	26,1
6	22,4	22,6	26,2
7	33,4	29,8	38,7
8	25	24,2	29,4
9	33,4	33,8	38,5
10	24,8	24,6	25
11	7	7	7,1
12	20,8	22	20
13	13,6	13,2	14,8
14	26	28,5	28,6
15	24,4	26	26,2
16	14,6	14	19,3
17	15,4	15,5	18,6
18	30	29	32
19	4,2	4,1	3,55
20	11	12	11,6
21	13	13,1	12,5
22	26,8	26	26,5
23	16,4	16,5	14,55
24	31	29,5	33,2
25	24	27,5	25,5

II - LE DOSAGE DE LA CITRULLINE

Outre son utilité pour l'étude de l'uréogénèse, l'intérêt du dosage de la citrulline est lié à l'intérêt de la mesure de l'activité de l'ornithine-carbamyl-transférase (EC 2-1-3-3). Cette enzyme, appelée couramment O.C.T. est présente presque exclusivement dans le foie (REICHARD 1958).

L'O.C.T. catalyse la conversation reversible de l'ornithine en citrulline :



La réaction se fait habituellement dans ce sens. Mais KNIVETT (1954) et KREBS et coll. (1955) ont montré qu'en présence d'arséniate la réaction se fait en sens inverse. Le carbamyl-arséniate instable se décompose en $\text{CO}_2 + \text{NH}_3$



Pour mesurer l'O.C.T., trois types de méthodes existent à l'heure actuelle. Elles diffèrent par les produits de réaction analysés. :

1 - Le dosage du $^{14}\text{C O}_2$ (REICHARD 1958)

2 - Le dosage de l'ammoniac (BALLAN et coll. 1959, MORETTI et coll. 1960, 1961, 1963, 1966, GACON 1960, LAFAIX 1962, DEMANGE et coll. 1962 et GIRARD et coll. 1963).

La mesure de l'activité de l'O.C.T. par l'ammoniac formé, préconisé par REICHARD (1958) a été particulièrement étudié en France par MORETTI et ses élèves. Ce dosage a été adapté sur appareil automatique par GIRARD, ROUSSELET et KOCH (1963).

3 - Le dosage de la citrulline par la diacétylmonoxime.

Décrit par GRISOLLIA (1955) ce dosage a été appliqué à la mesure de l'O.C.T. sérique par BROWN et GRISOLLIA (1958), puis par KULHANEK et coll. (1963-1964), par LELUAN (1964) et récemment par CERIOTTI et GAZZANIGA (1966).

Cette méthode a également été utilisée en France pour mesurer l'activité de l'O.C.T. dans différents tissus et organes (DASTUGUE et coll. 1963, BASTIDE et coll. 1963-1966).

Ces trois types de méthodes de dosage de l'O.C.T. ont contribué à définir le syndrome de cytolysé hépatique (BOIVIN 1961). Cette enzyme, spécifiquement

intra-hépatique, n'est donc libérée que lors de l'atteinte de cet organe. La nécrose hépatocellulaire expérimentale par le tétrychlorure de carbone (REISSMANN et coll. 1954) a permis l'étude de cette enzyme dans la sang (BROWN et GRISOLLIA 1958, BALLAN et coll. 1959, CRISTOL et coll. 1964). Ce toxique en effet porte atteinte aux membranes cellulaires et provoque la libération des enzymes (ZIMMERMANN et MAO 1965). Le dosage de l'O.C.T. du sérum permet de diagnostic biologique d'atteinte hépatique, même très légère (MORETTI 1963, KRAWCZYNSKA 1965).

Les réactions colorées avec les alpha-dicétones ont été mises au point pour la recherche et le dosage de la citrulline (FEARON 1939, GORNALL et HUNTER 1941, ARCHIBALD 1944, KAWERAU 1946, OREKHOVIC 1949, WINGO et DAVIES 1949, ELODI 1954, MOCKLER 1960, CAVACHINI 1964), dans les tissus, le sang, les protéines ou dans les préparations pharmaceutiques avant d'être appliquées à la mesure de la citrulline formée par l'O.C.T.. Les conditions de développement de ces réactions colorées peuvent être tirées du tableau synoptique (pages 14 à 21). Les milieux acides sont très divers. Le réactif dicétonique est habituellement la diacétylmonoxime sauf dans les techniques de KULHANEK et coll. (1963-1964) qui préconisent la diacétyldioxime. Des composés intensifiants ont été ajoutés : phénylhydrazine (ELODI 1954 puis MOCKLER 1960 et LELUAN 1964), phénazone (KULHANEK et coll. 1964, CERIOTTI 1966). Cependant, souvent est encore utilisée la technique d'ARCHIBALD (1944) (MISTRY et GRILLO 1960, BROWN et BROWN 1965, etc ...).

L'application de ces techniques aux milieux biologiques pose des problèmes en particulier la séparation des protéines (dialyse, défécation) et l'élimination de l'urée (passage sur résines, traitement par l'uréase).

La méconnaissance de l'interférence des protéines ou de l'urée a conduit à des résultats erronés non inexpliqués par leurs auteurs :

- coloration plus intense de la citrulline en présence de protéines (WINGO et DAVIS 1949)

- valeurs nettement plus élevées des taux de citrulline dosée par la diacétylmonoxime dans les milieux biologiques complexes, par rapport à une méthode chromatographique (BRONK et FISCHER 1956).

CROKAERT et BAROEN (1965) ont critiqué récemment des théories émises par certains auteurs à partir de résultats obtenus par ces méthodes colorimétriques. L'urée et la citrulline en plus de leur coloration respective, semblent interférer l'une dans le dosage de l'autre (RATNER 1955, MAC LEAN et coll. 1965, CROKAERT et BAROEN 1965, WATTS et coll. 1965) et la coloration obtenue est supérieure à la somme des colorations respectives de l'urée et de la citrulline.

Le dosage de la citrulline dans les milieux biologiques complexes, nécessite donc la connaissance approfondie des possibilités réelles des réactions colorées alpha-dicétones-dérivés carbamidés.

Les méthodes de dosage de la citrulline présentées à la suite sont basées sur les résultats décrits dans la Troisième Partie de ce Travail (chapitre deuxième).

DOSAGE DE LA CITRULLINE PAR LA DIACÉTYLMONOXIME EN MILIEU ARSENICOSULFURIQUE

La technique de dosage de la citrulline est identique à celle de l'urée (voir précédemment) à l'exception du temps de bain-marie bouillant qui n'est que de 10 minutes car la réaction citrulline-diacétylmonoxime se développe plus rapidement.

Les lectures sont effectuées à 490 nm. Le graphique 93 présente la courbe d'étalonnage obtenue avec des quantités croissantes de solution M/1000 de citrulline (0,175 g pour 1000).

DOSAGE DE LA CITRULLINE PAR LA DIACÉTYLMONOXIME EN PRESENCE DE PHÉNAZONE

Cette technique très sensible est particulièrement adaptée au dosage de la citrulline formée au cours de la réaction enzymatique contrôlée par l'ornithine-carbamyl-transférase. En effet, après traitement par l'uréase puis défécation, les milieux biologiques témoins donnent une coloration appréciable. La sensibilisation de la réaction colorée permet une dilution importante et donc des "blancs" négligeables.

REACTIFS

- I - Solution aqueuse de phénazone M/10 (18,8 g pour 1000)
- II - Réactif arsénicosulfurique (AsO_4H_3 10 g dans SO_4H_2 à 50 %)
- III - Solution aqueuse de diacétylmonoxime à 1 g pour 100 ml
- IV - Solution stock de citrulline M/100 (0,175 g pour 1000) à conserver à +4°
- V - Dilution extemporanée de citrulline M/5000

MODE OPERATOIRE

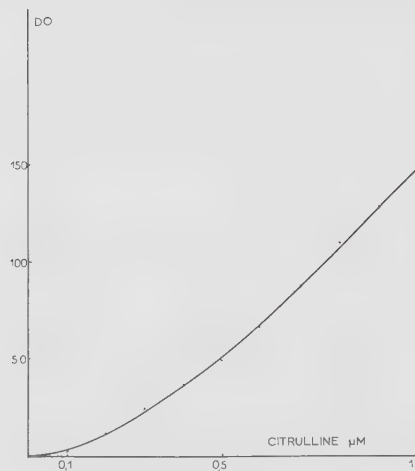
- | | |
|--|---------------|
| - Citrulline | Prise d'essai |
| - Réactif arsénicosulfurique | 2 ml |
| - Phénazone (réactif I) | 0,5 ml |
| - Diacétylmonoxime (réactif III) | 1 ml |
| - Eau distillée q.s.p. | 6 ml |

Mélanger. Bain-marie bouillant 20 minutes. Refroidir 10 minutes. Lecture au spectrophotomètre à 460 nm.

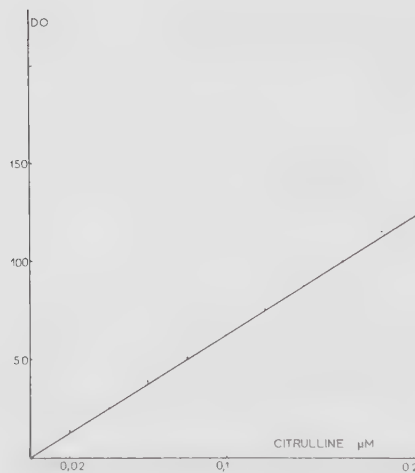
GAMME D'ETALLONAGE

Développer des colorations à partir de quantités croissantes de 0,1 à 1 ml de solution de citrulline M/5000 (0,2 μM par ml).

Le graphique 94 présente le tracé d'étalonnage. Il est linéaire.



Graphique 93. Dosage de la citrulline par la diacétylmonoxime en milieu arsénicosulfurique . Courbe d'étalonnage (Spectrophotomètre 490 nm)



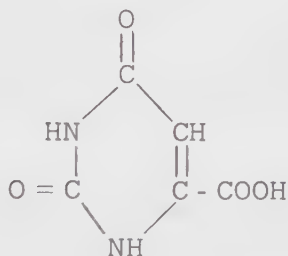
Graphique 94. Dosage de la citrulline par la diacétylmonoxime en présence de phénazone. Tracé d'étalonnage (Spectrophotomètre Safas 460 nm)

III - REACTIVITE DES BASES PYRIMIDIQUES ET PURIQUES ET DE LEURS PRODUITS D'HYDROLYSE

Les bases puriques et pyrimidiques possèdent un groupement carbamidé dans leur noyau.

KIDO (1957) a montré qu'après oxydation, ces composés donnent une coloration rouge violette avec la diacétylmonoxime et le thiosemicarbazide par chauffage à 100°. Mais, d'après BANCHI et LOMUTU (1960) ces réactions colorées sont développées à partir des composés à l'état solide, ce qui est nettement différent des conditions opératoires utilisables pour des milieux biologiques. C'est pourquoi nous avons entrepris des essais dans nos conditions opératoires avec l'acide orotique (dérivé pyrimidique) et avec l'acide urique (base purique) et ses produits de dégradation, l'allantoïne et l'acide allantoïque.

I - ESSAIS AVEC L'ACIDE OROTIQUE



L'étude de la réactivité de ce composé avait pour but de mettre en évidence son interférence éventuelle dans les dosages de l'urée. En effet l'utilisation thérapeutique à forte dose de ce composé dans les affections hépatiques (KRISKA 1966) ou dans la goutte (DELBARRE 1963) et l'apparition de quantité élevée dans certaines déviations métaboliques (HUGULEY 1959, BECROFF 1965), ou après traitement par des anticancéreux (BUTTOO 1965) pouvaient provoquer des erreurs importantes dans les dosages de l'urée dans les liquides biologiques.

Les essais effectués en milieu phosphorique et arsénicosulfurique avec la diacétylmonoxime en présence ou non de thiosemicarbazide, se sont révélés négatifs même en introduisant directement 3 mg d'acide orotique dans le mélange réactionnel.

II - ESSAIS AVEC L'ACIDE URIQUE, L'ALLANTOÏNE ET L'ACIDE ALLANTOÏQUE

L'acide urique provient du catabolisme des bases puriques, après désamination puis oxydation de celles-ci. Chez l'homme, il est en majorité excrété tel quel dans les urines.

DEGRADATION DE L'ACIDE URIQUE

SUBSTRATS	ENZYMES	Répartition des enzymes dans le règne animal	Produits d'excrétion du catabolisme purique	Transformations chimiques
ACIDE URIQUE forme lactame <chem>O=C1NC(=O)NC(=O)N1</chem>	URICASE pH optima 9, 3	Mammifères en général gastéropodes, diptères. Absente : Hommes Singes Reptiles Oiseaux Insectes en général	(allantoïne (((acide urique ((	Oxydation par l'iode en milieu bicarbonaté. Oxydation par l'oxygène atmosphérique dès que le pH est supérieur à 7, 6 → ALLANTOÏNE et autres dérivés
ALLANTOÏNE <chem>NC(=O)NC(=O)N</chem>	ALLANTOÏNASE	Poissons téléostéens	(acide allantoïque	Hydrolyse alcaline complète par NaOH 0,5 H à 100° (YOUNG, 1942) Hydrolyse partielle : - cas de l'urine alcaline - simple conservation à pH9 pendant 24 h. à 37° (CROKAERT 1959) → ACIDE ALLANTOIQUE
ACIDE ALLANTOÏQUE <chem>NC(=O)NC(=O)NC(=O)O</chem>	ALLANTOÏCASE	Batraciens Poissons Lamellibranches d'eau douce	(urée (	Hydrolyse acide complète par HCl à 100° (CHRISTMANN 1944) Hydrolyse partielle spontanée à pH 2,5 sur colonne Dowex 50 (CROKAERT 1959) Hydrolyse partielle dès que le pH est inférieur à 5 → ACIDE GLYOXYLIQUE + UREE
ACIDE GLYOXYLIQUE COOH - CHO + UREE (2 molécules) NH₂ - CO - NH₂	UREASE	Crustacés Sipunculien Lamellibranches marins	(carbonate d'ammonium (	

Mais l'acide urique peut à son tour être catabolisé par étapes successives :

- 1 - Décarboxylation oxydative par l'uricase et formation d'allantoïne
- 2 - Ouverture du noyau imidazole par l'allantoïnase et formation d'acide allantoïque
- 3 - Dégradation finale par l'allantoïnase et formation de deux molécules d'urée et d'une molécule d'acide glyoxylique
- 4 - Hydratation de l'urée par l'uréase et formation de carbonate d'ammonium

Les différentes enzymes nécessaires à ce catabolisme ont été retrouvées dans les végétaux, dans les microorganismes et chez les animaux. Le schéma ci-après résume les étapes successives de la dégradation de l'acide urique.

Habituellement, ce que réalisent les enzymes avec facilité, rapidité et élégance, des conditions chimiques ou physico-chimiques douces ont du mal à le réaliser.

Ce n'est pas le cas avec les produits de catabolisme purique qui sont instables et se dégradent assez facilement dès que le milieu est - soit légèrement alcalin (acide urique, allantoïne) - soit légèrement acide (acide allantoïque).

Cette instabilité est à la base des difficultés rencontrées pour l'étude de ces composés.

Contrairement à l'acide urique, l'allantoïne et l'acide allantoïque, composés provenant du catabolisme de l'acide urique ou parallèlement des transformations chimiques de cet acide réagissent avec les alpha-dicétones en milieu acide pour donner des complexes colorés (voir Troisième Partie, chapitre deuxième). En vue d'un dosage colorimétrique spécifique de l'acide urique, nous avons étudié la réactivité de l'acide urique, de l'allantoïne et de l'acide allantoïque (SIEST G. 1965).

a) Réactivité de l'acide urique

ABELIN (1940), BARKER (1944), ARCHIBALD (1945), WHEATLEY (1948) n'avaient pas obtenu de réaction colorée avec l'acide urique et les alpha-dicétones en milieu acide. Dans les conditions opératoires décrites précédemment, pour l'urée, nous n'avons pas plus noté de réaction positive.

Nous avons tenté de dégrader l'acide urique par chauffage en milieu alcalin. Une solution alcaline diluée est la plus efficace (NaOH 0,05 N) mais la transformation en allantoïne n'est pas encore totale après 60 minutes de bain-marie bouillant.

Par contre, après action de l'uricase (24 heures à 37°), cette transformation est plus complète et il est possible de doser l'allantoïne formé.

b) Réactivité de l'allantoïne

PEARON (1939) avait déjà noté que l'allantoïne donnait une coloration avec la diacétylmonoxime. Mais ce composé ne réagit que lentement avec les α -dicétones (ARCHIBALD 1944-1945, KAWERAU 1946). Les essais que nous avons effectué pour améliorer la cinétique et l'intensité n'ont donné que peu de résultats (Troisième Partie, chapitre deuxième). Un long temps de chauffage est nécessaire.

Nous avons cependant tenté le dosage de l'allantoïne provenant de l'oxydation de l'acide urique par l'uricase.

A titre d'exemple nous avons représenté dans le tableau ci-dessous l'intensité des colorations obtenues à partir d'un sérum surchargé par des quantités croissantes d'acide urique. Les sérums ont été soumis à l'action de l'uréase, (pour détruire l'urée) de l'uricase (pH 9,3 tampon glycolcolle) pendant 16 heures à 37° ; puis après défécation trichloracétique, nous avons développé la réaction colorée de l'allantoïne (2 ml de défécât correspondant à 0,5 ml de sérum surchargé, 2 ml de réactif arsénicosulfurique, 1 ml de diacétylmonoxime M/10 pour 6 ml, bain-marie bouillant 60 minutes).

Tableau : Intensités des réactions colorées après action de l'uricase sur l'acide urique

Acide urique M/1000 (168 mg/litre) ml	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Sérum normal ml	1	1	1	1	1	1
D.O. à 480 nm	0,70	0,93	1,18	1,36	1,65	1,84

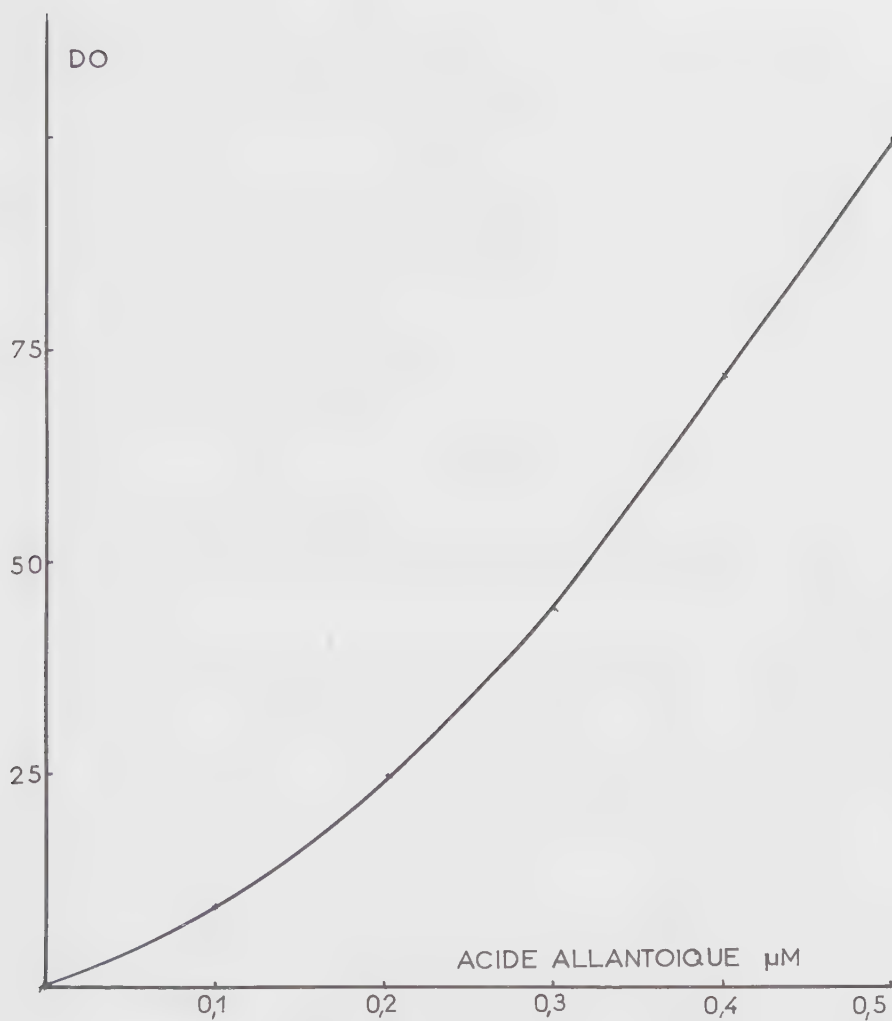
Les colorations sont donc proportionnelles au taux d'acide urique. Mais le dosage de l'allantoïne nécessite un chauffage prolongé et nous avons préféré hydrolyser l'allantoïne en acide allantoïque qui donne une réaction colorée intense et rapidement développée.

YOUNG et CONWAY (1942) utilisèrent les premiers une hydrolyse alcaline pour transformer l'allantoïne :

- 5 ml d'urine diluée
- 1 ml NaOH 0,5 N

Bain-marie bouillant 7 minutes. Refroidir.

Nous avons adapté ces conditions d'hydrolyse à notre problème en vérifiant les concentrations minima de soude pour un temps de chauffage constant.



Graphique 95. Dosage de l'acide allantoïque par la diacétylmonoxime en milieu arsénicosulfurique. Courbe d'étalonnage (spectrophotomètre Safas 480 nm)

Pour hydrolyser complètement 0,25 μ M d'allantoïne contenu dans un volume de 2,5 ml, il suffit d'ajouter 0,5 ml de NaOH 0,1 N et de mettre l'ensemble au bain-marie bouillant 10 minutes. Nous utilisons une quantité de soude plus grande pour être certains d'une alcalinité suffisante.

Nous avons vérifié auparavant le temps de chauffage minimum nécessaire. Les quantités d'allantoïne hydrolysées en fonction du temps de chauffage croissent très rapidement jusqu'à 5 minutes puis lentement jusqu'à 7 minutes où l'hydrolyse est pratiquement totale. Un temps de 10 minutes a été retenu pour une sécurité parfaite.

Le problème de transformer l'allantoïne en acide allantoïque est donc simple.:

c) Réactivité de l'acide allantoïque

L'acide allantoïque donne une réaction colorée de même caractéristique que l'urée mais, sur une base molaire, d'intensité double (Troisième Partie, chapitre deuxième). Toutes les techniques présentées pour l'urée sont donc valables avec ce composé.

Nous avons retenu pour doser l'acide allantoïque, la technique avec la diacétylmonoxime en milieu arsénicosulfurique (page 225) :

- Prise d'essai d'acide allantoïque
- Réactif arsénicosulfurique dilué 4 ml
- Diacétylmonoxime à 1 %..... 1 ml
- Eau distillée q.s.p. 6 ml

Bain-marie bouillant 20 minutes. Refroidir 10 minutes.

Lecture au spectrophotomètre à 480 nm.

L'étalonnage est réalisé avec une solution d'acide allantoïque M/2000 (0,5 μ M par ml). Le graphique 95 présente le tracé obtenu.

Sachant qu'une molécule d'acide allantoïque provient d'une molécule d'acide urique, cette gamme d'étalonnage permet de doser de 0,1 à 0,5 μ M d'acide urique c'est-à-dire 16,8 à 84 μ g dans la prise d'essai. Pour couvrir les valeurs normales et pathologiques de l'uricémie, cette prise d'essai doit correspondre à 0,5 ml de sérum (contenant donc de 33,6 mg à 168 mg d'acide urique par litre).

CONCLUSIONS GENERALES

Dans la Première Partie de ce Travail, nous avons étudié les réactions colorées que donnent en milieu acide le diacétyle, la phénylpropanedione et leurs oximes avec l'urée. Nous avons comparé les modalités opératoires très diverses et les nombreux réactifs proposés dans plus d'une centaine de publications.

Nous avons montré que d'autres acides que ceux habituellement préconisés, permettent le développement de la réaction urée-diacétylmonoxime : acide arsénique, citrique, formique, monochloracétique, paratoluènesulfonique et sulfosalicylique. La nature et la concentration des acides ont une grande importance : ils déterminent la sensibilité, la cinétique, la stabilité de la réaction colorée ; ils déterminent également l'activité de différents composés ajoutés dans le mélange réactionnel avant ou après le chauffage.

De nombreux composés ont été en effet proposés pour améliorer les réactions des dérivés carbamidés avec les alpha-dicétones aliphatiques : oxydants, réducteurs, adjuvants divers. Nous avons mis en évidence que d'autres composés tels le cuivre en milieu chlorhydrique ou le fer en milieu phosphorique, ou encore l'acétone, le tryptophane étaient capables d'intensifier très nettement les colorations. Nous avons montré que l'action de tous ces composés est essentiellement de modifier la cinétique de la réaction et qu'il n'était pas possible de définir une inhibition ou une intensification sans préciser la cinétique.

Ces résultats obtenus avec la diacétylmonoxime ont été vérifiés avec le diacétyle, la diacétyldioxime, la phénylpropanedione et la phénylpropanedionemoxime. Une comparaison entre tous ces réactifs dicétoniques est donc possible.

Nous avons insisté sur la nécessité d'une distillation préalable du diacétyle. Les alpha-dicétones ne sont pas stables et donnent alors des réactions colorées d'intensité moindre.

Mais avec un produit fraîchement distillé, les réactions colorées obtenues sont d'intensité supérieure, de cinétique plus rapide que celles de la monoxime et de la dioxime.

L'hydroxylamine libérée par hydrolyse des oximes interfère : elle a bien en effet un certain pouvoir inhibiteur mais nous avons montré que la présence de composé était bénéfique pour la stabilité des colorations à la lumière.

La photosensibilité est en effet un des inconvénients majeurs de ces réactions colorées. Après une étude d'ensemble de l'influence des réactifs et des conditions opératoires sur la sensibilité des colorations, à la lumière, nous pouvons dire qu'une concentration élevée en acides et en réactif dicétonique, qu'un temps de chauffage prolongé sont des facteurs de stabilité. Mais la nature de l'acide et du réactif dicétonique, ainsi que celle des différents adjuvants, intervient aussi.

Les essais réalisés dans la Première Partie nous ont permis de proposer différentes améliorations aux réactions colorées existantes, tels qu'un mélange réactionnel moins corrosif ou une réaction colorée plus rapidement développée.

Dans la Deuxième Partie de ce Travail nous décrivons trois nouvelles réactions colorées mettant en œuvre des alpha-dicétones cyclaniques : heptoxime, cyclohexanedione et nioxime.

L'heptoxime développe avec l'urée en milieu acide et à 100° une coloration jaune ayant un maximum d'absorption à 475 nm. Cette réaction colorée est photostable.

La cyclohexanedione et la nioxime donnent avec l'urée à 37° et en milieu acide, une coloration violette qui évolue vers le bleu puis le vert. Vu l'instabilité de la cyclohexanedione, seule la réaction de la nioxime développée à température basse présente un intérêt. Peu sensible, cette coloration est nettement intensifiée par l'acétone.

Dans la Troisième Partie de ce Travail, nous avons apporté notre contribution à la définition des complexes colorés formés.

Seules les alpha-dicétones peuvent donner une réaction colorée avec les dérivés carbamidés. De plus un groupement méthyle libre voisin d'une des fonctions carbonyle semble nécessaire.

Une réaction positive est obtenue avec les dérivés monosubstitués de l'urée mais elle se différencie de celle de l'urée par le spectre, la cinétique et d'autres conditions opératoires.

Par la méthode des variations continues, nous avons montré qu'à une molécule de diacétyle, de phénylpropanedione et de leurs oximes, et d'heptoxime, il est nécessaire d'ajouter une molécule d'urée ou de dérivé monosubstitué pour avoir la coloration la plus intense. Les alpha-dicétones et les dérivés carbamidés entrent donc dans un complexe coloré, en quantité équimoléculaire.

L'ensemble des résultats présentés dans la Troisième Partie de ce Travail permet d'exclure certaines des hypothèses avancées pour la structure des complexes colorés.

Enfin dans la Quatrième Partie de ce Travail nous présentons une succession de techniques basées sur les résultats obtenus dans les Première, Deuxième et Troisième Parties et adaptées aux milieux biologiques.

Pour le dosage de l'urée nous avons proposé sept méthodes différentes. Chacune répond à un but défini :

- présenter un réactif acide connu (réactif arsénicosulfurique) dans les conditions opératoires trouvées les meilleures

- proposer pour son remplacement, un réactif phosphoferrique moins corrosif et non toxique et donnant une réaction colorée plus rapidement développée
- décrire, pour le dosage de l'urée, en présence de dérivés monosubstitués biologiques, une technique plus spécifique (avec la phénylpropanedionemoxime)
- obtenir une réaction colorée photostable avec l'heptoxime.

Ces quatre méthodes nécessitent au préalable une déprotéinisation. Mais après avoir longtemps cherché à éviter l'interférence des protéines, nous sommes parvenus à ce résultat : doser l'urée directement, même dans un milieu fortement protéique. Ce but a été atteint par le choix de réactions colorées extrêmement sensibles.

Enfin nous avons décrit une dernière méthode plus particulièrement adaptée au dosage de l'urée urinaire et basée sur la réaction avec la nioxime.

Le deuxième dérivé carbamidé biologique présentant le plus d'intérêt est la citrulline. Ce composé est un des produits de la réaction contrôlée par l'ornithine carbamyltransférase, enzyme localisée presque exclusivement dans le foie, donc spécifique à cet organe. Pour le dosage de la citrulline nous proposons une technique très sensible, permettant de réduire la prise d'essai de matériel biologique et évitant ainsi l'interférence de différents composés biologiques.

Enfin nous avons montré qu'il était possible de doser par la diacétylmoxime, l'acide urique après une double dégradation enzymatique et chimique, et formation d'acide allantoïque.

Ces exemples présentés dans la Quatrième Partie de ce Travail illustrent l'intérêt de ces méthodes de dosages, basées sur les réactions colorées entre α -dicétones aliphatiques ou cyclaniques et dérivés carbamidés. Les techniques colorimétriques sont aujourd'hui les plus utilisées. Mais elles seront peut-être remplacées demain par les techniques fluorimétriques encore plus sensibles. Les premiers essais que nous avons déjà effectués avec les mêmes réactifs dicétoniques laissent entrevoir des résultats prometteurs.

L'application, aujourd'hui des techniques colorimétriques, demain des techniques fluorimétriques, à la mesure des dérivés carbamidés biologiques permettra de poursuivre l'étude d'un des processus biologiques les plus importants, la carbamylation. La carbamylation est au carrefour de deux voies du métabolisme azoté : l'une conduit à la citrulline puis aux dérivés guanidiques ; l'autre, par l'intermédiaire du carbamyl-aspartate, donne naissance aux bases pyrimidiques.

L'intérêt des dérivés guanidiques et des bases pyrimidiques n'est plus à démontrer et il est nécessaire de disposer de techniques simples et sensibles qui permettent d'étudier les étapes intermédiaires de leur métabolisme et, en particulier de rechercher les interférences médicamenteuses à cet échelon cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

ABELIN (I)

"Über den mikrochemischen Nachweis des Harnstoffes in biologischen Flüssigkeiten und Geweben"
Schweiz. Med. Wochenschr. 1940, **21** 1062-1063.

ALEXANDER (P) et STACEY (K.A.)

"Dissociation of deoxyribonucleic acid by urea"
Nature. 1955, **176** 162.

ALTWEIN (D.M.), DELGADO (J.N.) et COSGROVE (F.P.)

"Effect of urea concentrations on the solubility of the isomeric monohydroxybenzoic acids"
J. Pharm. Sciences. 1965, **54** 603-606.

ANDERSEN (C.J.) et STRANGE (B.)

"Colorimetric determination of urea"
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1959, **11** 122.

ARCHIBALD (R.M.)

"Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma"
J. Biol. Chem. 1944, **156** 121.

ARCHIBALD (R.M.)

"Colorimetric determination of urea"
J. Biol. Chem. 1945, **157** 507.

BALDI (A.)

"Sulla determinazione dell'azoto ureico con la diacetilmonossima"
Igiene e sanità pubblica. 1960, **16** 23-29.

BALLAN (P), DEMANGE (G), MORETTI (G) et STAEFFEN (J)

"Le dosage de l'activité ornithine carbamyltransférase du sérum"
Presse Med. 1959, **67** 2253-2254.

BANCHI (G) et LOMUTU (E)

"Analisi Colorimetrica qualitativa e quantitativa Dell' Acido orotico"
Il. Farmaco ED. Pr. 1960, **15** 606-616.

BANERJEE (R)

"Action de l'urée et du chlorhydrate de guanidine sur les propriétés oxyréductrices de l'hémoglobine et de complexes apparentés"
Thèse Sciences Paris. 1959.

- BARKER (S.B.)
 " The direct colorimetric determination of urea in blood and urine "
 J. Biol. Chem. 1944, **152** 453.
- BARRITT (M.M.)
 " The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naphthol "
 J. Path. Bacteriol. 1936, **42** 441.
- BASTIDE (P), BAUDON (J), MEUNIER (S) et DASTUGUE (G)
 " Activité Benzoyl-arginine-éthyl-estérasique et ornithine-carbamyl-transférasique dans le placenta, le sang maternel et celui du nouveau-né "
 Ann. Biol. Clin. 1963, **21** 265-269.
- BASTIDE (P), RIGAL (M.T.) et DASTUGUE (G)
 " Activité ornithine carbamyltransférasique (O.C.T.) dans le foie de Souris après intoxication au tétrachlorure de carbone "
 J. Physiol. 1966, **58** 202.
- BEALE (R.N.) et CROFT (D)
 " A sensitive method for the colorimetric determination of urea "
 J. Clin. Path. 1961, **14** 418-424.
- BECROFT (D.M.O.) et PHILLIPS (L.I.)
 " Hereditary Orotic Aciduria and Megaloblastic Anaemia : A second case, with response to uridine "
 Brit. Med. J. 1965, **1** 547-552.
- BELTING (C.M.)
 " In vitro Effect of urea on artificial calculus Formation -I "
 " In vivo Effect of a urea containing dentifrice on dental calculus Formation -II "
 J. periodontology. 1966, **37** 20-26.
- BERAN (P) et BERKA (A)
 " Dosage de l'urée dans les solutions de lessive-mère des fabriques de soude "
 Svarek. 1965, **59** 859-864.
- BILTZ (H)
 " Zur Kenntnis der Diureine "
 Berichte. 1907, **40** 4806.
- BINAGHI (R), HALPERN (B.N.), LIACOPOULOS (P) et NEVEU (T)
 " Promoting effect of urea on the in vitro passive sensitivation of isolated plain muscles with precipitating antibody "
 Nature. 1959, **184** 1805.

- BOIVIN (P), AUZEPY (P) et FAUVERT (R)
 " Le syndrome de cytolyse hépatique "
 Ann. Biol. Clin. 1961, **19** 793-821
- BOLTON (S)
 " Interaction of urea and Thiourea with Benzoic and salicylic Acids "
 J. Pharm. Sc. 1963, **52** 1071.
- BOUCHARDAT (G)
 " Faits pour servir à l'histoire de l'urée "
 Thèse. Méd. Paris. 1869.
- BRONK (J.R.) et FISCHER (R.B.)
 " The penetration of ornithine and citrulline into liver slices "
 Biochem. J. 1956, **64** 106-111.
- BROWN (H.) et BROWN (J.)
 " Urea cycle Enzymes after portocaval Shunting "
 J. Am. Med. Assoc. 1965, **192** 382-384.
- BROWN (G.W.)
 " Studies in comparative biochemistry and evolution. I Avian liver arginase "
 Arch. Biochem. Biophys. 1966, **114** 184-194.
- BROWN (R.W.) et GRISOLIA (S)
 " Ornithine transcarbamylase activity in serum "
 J. Lab. Clin. Med. 1959, **54** 617-620.
- BRUCE (M.I.), ZWAR (J.A.) et KEFFORD (N.P.)
 " Chemical Structure and Plant Kinin Activity - The activity of urea and thiourea derivatives "
 Life Sciences. 1965, **4** 461-466.
- BRUYET (P)
 " Dosage de l'urée par la diacétylmonoxime "
 Feuilles de Biologie. 1965, **6** 23-24.
- BUTTOO (A.S.), ISRAELS (M.C.G.) et WILKINSON (J.F.)
 " Hypocholesterolaemia and orotic aciduria during treatment with 6 Azauridine "
 Brit. Med. J. 1965, **1** 552-554.
- CARAWAY (W.T.) et FANGER (H)
 " Ultramicro Procedures in clinical chemistry "
 Am. J. Clin. Path. 1955, **25** 317-331.

- CARAWAY (W.T.) et FANGER (H)
 "Improved ultramicro procedure for determination of urea nitrogen in serum"
 Am. J. Clin. Path. 1956, **26** 1475-1476.
- CAVALIERI (L.F.) et ROSEMBERG (B.H.)
 "Studies on the structure of nucleic acids XI. The roles of heat and acid in desoxyribonucleic acid denaturation"
 J. Am. Chem. Soc. 1957, **79** 5352.
- CAVICCHINI (G), FAZI (L) et ALMIRANTE (L)
 "Dosaggio degli amino acidi del ciclo ureopoietico di Krebs-Henseleit : L-arginina L-ornitina e L-citrullina"
 Boll. Chim. Farm. 1964, **103** 65-68.
- CERIOTTI (G) et SPANDRIO (L)
 "A spectrophotometric method for determination of urea"
 Clin. Chim. Acta. 1963, **8** 295-299.
- CERIOTTI (G) et SPANDRIO (L)
 "Catalytic acceleration of the urea - diacetylmonoxime - phenazone reaction and its application to automatic analysis"
 Clin. Chim. Acta. 1965, **11** 519-522.
- CERIOTTI (G) et GAZZANICA (A)
 "A sensitive method for serum ornithine carbamyl transferase determination"
 Clin. Chim. Acta. 1966, **14** 57-62.
- CHEMETRON Chimica. Azoto ureico
 "Methodiche colorimetriche applicate all' indagine clinica"
 Chemetron Chimica - Milano. 1966.
- CHRISTMANN (A.A.), FOSTER (P.W.) et ESTERER (M.B.)
 "The allantoin content of blood"
 J. Biol. Chem. 1944, **155** 161-171.
- CITRI (N) et GARBER (N)
 "The effect of urea on the activity of penicillinase"
 Bioch. Biophys. Acta. 1958, **30** 664-665.
- CORTINA (P) et PESTANA (A)
 "Influencia de la inanición sobre la arginasa hepática en ratas"
 Revista Española de Fisiología. 1966, **22** 47-48.

- COTTE (J)
 "Urée sanguine et urinaire : Ultra microméthode utilisant le réactif à la diacétylmonoxime glucuronolactone"
 Plaqueette des Journées Nationales de Biologie - Lyon 1966.
- COULOMBE (J.J.) et FAVREAU (L)
 "A new simple semimicro method for colorimetric determination of urea"
 Clin. Chem. 1963, **9** 102-108.
- COURMEL (P), BAGROS (P) et BAYLON (H)
 "Données physiopathologiques et thérapeutiques sur la lithiase urinaire"
 Gaz. Méd. Fr. 1961, **68** 1205-1220.
- CRISTOL (P), MACABIES (J) et AYAVOU (T)
 "Etude comparée de quelques activités enzymatiques du sang chez le chien avant et après intoxication au tétrachlorure de carbone"
 C. R. Soc. Biol. 1964, **158** 1703.
- CROKAERT (R) et SCHRAM (E)
 "Dosage des N-Carbamoyldérivés d'acides aminés par la diacétylmonoxime"
 Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, **40** 1093-1106.
- CROKAERT (R)
 "Etude de l'excrétion de l'allantoïne et de ses dérivés chez le rat et chez l'homme. Dosage de l'allantoïne par chromatographie"
 Bull. Soc. Chim. Biol. 1959, **41** 1001-1016.
- CROKAERT (R) et BAROEN (J.P.)
 "Biosynthèse de l'urée chez le rat. I - Essais in vitro avec des homogénats de foie"
 Bull. Soc. Chim. Biol. 1965, **47** 687-700.
- CROKAERT (R), BAROEN (J.P.) et WIESENFELD (M)
 "Biosynthèse de l'urée chez le rat. II - Inhibition in vitro par les acides α et β Methylaspartique"
 Bull. Soc. Chim. Biol. 1965, **47** 710-712.
- DAMM (H.C.) et KING (J.W.)
 "Blood urea nitrogen. Diacetyl monoxime method"
 Practical Manual for clinical Laboratory Procedures
 The chemical Rubber Co. Cleveland - Ohio - U.S.A. 1965.

DARGEL (R)

"Verbesserte Methode zur Bestimmung der Serumarginase Aktivität"

Z. Klin. Chem. 1966, **1** 36-37.

DASTUGUE (G), THIEBLOT (L), BASTIDE (P), BOYER (J) et BLAISE (S)

"Premières recherches sur les activités enzymatiques de la glande pinéale"

J. Physiol. 1963, **55** 133-134.

DAVIDSON (J.D.) et WINTER (T.S.)

"A method of analyzing for hydroxyurea in biological fluids"

Cancer chemotherapy reports. 1963, **27** 97-110.

DELBARRE (F) et AUSCHER (G)

"Oroturic - (acide uracil-6-carboxylique)"

Presse Méd. 1963, **37** 1765-1768.

DEMANGE (G), BALLAN (P), MORETTI (G), STAEFFEN (J), CATANZANO (G) et LAFAX (J.M.)

"Dosage de l'ornithine carbamyltransférase du sérum. Une méthode simple et sensible"

Presse Méd. 1962, **70** 1032-1034.

DEVAUX (G)

"Urée - Méthode à la Diacétylmonoxime". Choix de techniques de Biochimie clinique

Gauthier-Villars. Ed. Paris. 1962.

DICKENMAN (R.C.), CRAFTS (B) et ZAK (B)

"Use of alpha diketones for analysis of urea"

Am. J. Clin. Path. 1954, **24** 981-987.

DUCROCQ (A)

"Le roman de la vie"

Julliard Ed. Paris. 1966.

DUDEK (H)

"Neue Mikromethode für die qualitative Blutharnstoffbestimmung"

Clin. Chim. Acta. 1966, **14** 108-111.

DULIERE (W)

"The condition of creatine in amphibian voluntary muscle"

Biochem. J. 1929, **23** 921-923.

- DURIEUX (M), BROUHON (N) et HEUSGHEM (C)
 "La détermination de la glycémie et de l'urémie par méthode automatique"
 Ann. Biol. Clin. 1960, **18** 331.
- EASTERLY (W.D.)
 "Syntheses and antifungal activity of some amide and urea derivatives of bromal and dichloroacetaldehyde"
 J. Pharm. Sc. 1965, **54** 1358.
- ECHOLS (R)
 "Etude par diffraction des rayons X de la dénaturation uréique de la sérumalbumine bovine"
 J. Am. Chem. Soc. 1960, **82** 5085-5093.
- EGGLETON (P) et EGGLETON (G.M.)
 "Further observations on phosphagen"
 J. Physiol. 1928, **65** 15-24
- ELODI (P)
 "Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von Harnstoff und Zitru-
 lin"
 Acta. Phys. Acad. Scient. Hungariae. 1954, **6** 225-238.
- ENGLIS (D.T.), FISCH (E.J.) et BASH (S.L.)
 "Determination of Diacetyl"
 Anal. Chem. 1953, **25** 1373-1375.
- FAUVERT (R) et HARTMANN (L)
 "Urée - Dosage par la diacétylmonoxime". Techniques modernes
 de laboratoire.
 2ème édition. Expansion Scientifique Française. Ed. Paris 1960.
- FAUVERT (R) et HARTMANN (L)
 "Urée - Dosage par la diacétylmonoxime". Techniques modernes
 de laboratoire.
 3ème édition. Expansion Scientifique Française. Ed. Paris 1961.
- FEARON (W.R.)
 "The carbamido diacetyl reaction : a test for citrulline"
 Biochem. J. 1939, **33** 902.
- FERGUSON (R.C.) et BANKS (C.U.)
 "Spectrophotometric determination of nickel in calcium metal using
 1-2 Cyclohexanedionedioxime"
 Anal. Chem. 1951, **23** 448-453.

- FERGUSON (R.C.) et BANKS (C.U.)
 "Spectrophotometric determination of nickel using 1-2 Cycloheptanedionedioxime"
 Anal. Chem. 1951, **23** 1486-1487.
- FINGERHUT (B), FERZOLA (R), MARSH (W.H.) et MILLER (A)
 "Automated Methods for Blood glucose and urea"
 Clin. Chem. 1965, **11** 803.
- FINGERHUT (B), FERZOLA (R), MARSH (W.H.) et MILLER (A)
 "Automated Methods for Blood glucose and urea with adaptation for simultaneous determination"
 Clin. Chem. 1966, **12** 570-576.
- FOLLEY (S.J.) et GREENBAUM (A.L.)
 "Determination of the arginase activities of homogenates of liver and mammary gland : effect of pH and substrate concentrations and especially of activation by divalent metal ions"
 Biochem. J. 1948, **43** 537.
- FORSELL (O.M.) et PALVA (I.P.)
 "Rapid determination of urea"
 Ann. Med. Exp. Biol. Fenniae. 1960, **38** 293-295.
- FOSTER (J.F.), SAMSA (E.G.) et HANNA (G.F.)
 "Streaming orientation studies on denatured proteins - V. Bovine serum albumin"
 J. Am. Chem. Soc. 1954, **76** 6044.
- FOSTER (J.F.) et STERMAN (M.D.)
 "Conformation Changes in bovine plasma albumin associated with hydrogen ion and urea binding - II - Hydrogen ion titration curves"
 J. Am. Chem. Soc. 1956, **78** 3656.
- FRANCHIMONT (A.P.N.) et KLOBBIE (E.A.)
 "Quelques nouveaux dérivés de l'urée"
 Rec. Trav. Chim. Pays-Bas. 1888, **7** 12.
- FRANCHIMONT (A.P.N.) et KLOBBIE (E.A.)
 "Sur quelques uréides et leurs dérivés nitrés"
 Rec. Trav. Chim. Pays-Bas. 1888, **7** 236.
- FREMONT (S.F.) et FORBES (H.S.)
 "Intraocular and intracranial pressure experimental study"
 Arch. Neurol. Psych. 1927, **18** 550-554.

- FRIEDMAN (H.S.)
 "Modification of the determination of urea by the diacetylmonoxime method"
 Anal. Chem. 1953, **25** 662.
- GACON (J)
 "L'ornithine carbamyl-transférase du sérum"
 Thèse Méd. Bordeaux. 1960.
- GARCIA CANTURRI (F.J.)
 "Determinacion de urea en sangre"
 Medicina y Seguridad del Trabajo. 1958, **6** 59-62.
- GERHART (J) et PARDEE (A)
 "The Enzymology of Control by Feedback Inhibition"
 J. Biol. Chem. 1962, **237** 891-896.
- GILLIS (J), HOSTE (J) et Van MOFFAERT (Y)
 "Determination spectrophotométrique du nickel par l'heptoxime"
 Chimie analytique. 1954, **36** 43-47.
- GIRARD (M) et DREUX (Cl)
 "Application pratique de la diacétylmonoxime au dosage de l'urée"
 Ann. Pharm. Franç. 1958, **16** 604-610.
- GIRARD (M) et DREUX (Cl)
 "Intérêt du dosage de l'urée par la diacétylmonoxime - Avantages de la technique proposée"
 Ann. Biol. Clin. 1959, **17** 603.
- GIRARD (M), ROUSSELET (F) et KOCH (M)
 "La détermination de l'ornithine carbamyltransférase sérique par voie automatique"
 Ann. Biol. Clin. 1963, **21** 557.
- GLASMACHER (H) et PODZUS (B)
 "Die Harnstoffbestimmung im Blutplasma mit dem Mikrotitrator"
 Arz. Forsch. 1962, **12** 1209-1210.
- GLAZER (A.N.), Mc KENZIE (H.A.) et WAKE (R.G.)
 "Liberation of tyrosine hydroxyl groups in Urea Solutions of Bovine Serum Albumin"
 Nature. 1957, **180** 1286-1287.
- GOLDBERG (A.H.), GIBALDI (M) et KANIG (J.L.)
 "Increasing Dissolution Rates and Gastrointestinal Absorption of drugs Via Solid Solutions and Eutectic Mixtures - II - Experimental Evaluation of a Eutectic Mixture : Urea-Acetaminophen System"
 J. Pharm. Sc. 1966, **55** 482-486.

- GORNALL (A.G.) et HUNTER (A)
 "A colorimetric method for the determination of citrulline"
 Biochem. J. 1941, **35** 650.
- GREGORY (M.C.) et ROBINSON (J.R.)
 "Effects of urea upon the water and ionic content of liver slices"
 J. Physiol. 1965, **177** 122-132.
- GRILLO (M.A.) et FOSSA (T)
 "Urea synthesis in the liver of the hypothyroid rat"
 Clin. Chim. Acta. 1966, **13** 383-386.
- GRISOLIA (S)
 "Enzymatic citrulline synthesis". Methods in enzymology, Tome II p. 350"
 Academic Press. New-York. 1955.
- HALLUM (J.V.) et YOUNGER (J.S.)
 "Urea and thermal mutants of Polio virus"
 J. Bacteriol. 1966, **91** 2309.
- HALWER (M)
 "Disulfide Cross links in denatured ovalbumine"
 J. Am. Chem. Soc. 1954, **76** 183.
- HALVORSON (H.O.) et SCHULTZE (M.O.)
 "The colorimetric determination of urea in the blood of normal and uremic rats"
 J. Biol. Chem. 1950, **186** 471-476.
- HARDEN (A)
 "On Voges and Proskauer reaction for certain bacteria"
 Proceed. Roy. Soc. 1905, **77** - B - 424.
- HARDEN (A) et NORRIS (D)
 "The diacetylreaction for proteins"
 J. Physiol. 1911, **42** 332.
- HARRINGTON (W.F.) et SELA (M)
 "A comparison of the physical chemical properties of oxidized and reduced alkylated ribonuclease"
 Biochem. Biophys. Acta. 1959, **31** 427.
- HARVEY (D.C.) et RICHARDS (M.A.)
 "A comparison of two methods used for the determination of blood urea in the dog"
 Vet. Record. 1965, **77** 450-452.

- HAURY (H)
 "Bestimmung von Harnstoff mit stabilen Reagentien"
 Med. Klin. 1965, **60** 508-510.
- HENRY (R.J.)
 "Urea - Methods Employing Reaction with Diacetyl Monoxime and Related Compounds"
 Clinical Chemistry Hoeber Medical Division HARPER et Row. Ed. New-York 1964.
- HOLDEN (H.F.)
 "The determination of urea in blood"
 Austr. J. Exp. Biol. Med. Sciences. 1959, **37** 177-181.
- HOSPELHORN (V.D.), CROSS (B) et JENSEN (E.V.)
 "Sulphydryl dependent agregation accompagnyng the denaturation of bovine Plasma Albumin by urea"
 J. Am. Chem. Soc. 1954, **76** 2827.
- HUGULEY (C.H.), BAIN (J.A.), RIVERS (S.L.) et SCOGGIUS (R.B.)
 "Refractory Megaloblastic anaemia associated with excretion of orotic acid"
 Blood. 1959, **14** 615-634.
- HUNNINGHAKE (D) et GRISOLIA (S)
 "A sensitive and convenient micromethod for estimation of urea, citrulline and carbamyl derivatives"
 Anal. Biochem. 1966, **16** 200-205.
- HUTCHINSON (J.H.) et LABBY (D.H.)
 "Development of urea-cycle enzymes in the juvenile rat"
 Am. J. Digest. Dis. 1965, **10** 814-825.
- HYCEL-HOUSTON
 "Hycel Urea Nitrogen Determination"
 Réactifs HYCEL-HOUSTON (Texas) 1964.
- ILLNEROVA (H)
 "The development of arginase and ornithine transcarbamylase activities in the liver of rats"
 Physiol. Bohemoslovaca. 1966, **15** 19-22.
- ISRAELI (YJ)
 "Interprétation du spectre ultraviolet de la diméthylglyoxime"
 Bull. Soc. Chim. Fr. 1965 - 1895.

- IUCHI (I)
 "Some notes on the diacetyl monoxime Method for the determination of urea in biological fluid - Use of perchloric acid as oxidizing Reagent"
 Bull. Yamaguchi. Med. School. 1958, **6** 15-19
- IZAVA (S) et GOOD (N)
 "The number of sites sensitive to 3 - (3-4-dichlorophenyl).1, 1-dimethylurea 3-(4-chlorophenyl) 1, 1-dimethylurea and 2-chloro-4 (2-propylamino) 6-éthylamino-S-triazine in isolated chloroplasts"
 Biochem. Biophys. Acta. 1965, **102** 20-38.
- JACKSON (A.W.)
 "Colorimetric determination of viomycin"
 Antibiotics and chemotherapy 1954, **4** 1210-1215.
- JANCIC (M)
 "Microdosage colorimétrique de l'urée"
 Glasnick Drustva Hemicara. Technol. N.R. Bosne Hercegowie. 1952, **1** 21-27.
- JAVID (M) et SETTLAGE (P)
 "Effects of urea on cerebrospinal fluid pressure in human subjects. Preliminary reports"
 J. Am. Med. Assoc. 1956, **160** 943-949.
- JENSEN (H.L.) et KOUMARAN (K.A.)
 "Transformation microbiologique du biuret"
 Ann. Inst. Pasteur. Suppl. 1965, **109** 184-190.
- JEROME (H)
 "Dosage de l'urée dans le sang - I"
 Recueil de Techniques - Labo COOPER - France. 1966.
- JEROME (H)
 "Dosage de l'urée au diacétylmonoxime - II"
 Recueil de Techniques - Labo COOPER - France. 1966.
- JIRGENSONS (B) et SIROTZKY (S)
 "The optical rotation of human serum albumin and gamma globulin"
 J. Am. Chem. Soc. 1954, **76** 1367.
- JOB (P)
 "Recherches sur la formation de complexes minéraux en solution et sur leur stabilité"
 Ann. Chim. 1928, **9** 113.

KAMRIN (M)

"Anilides and phenylureas Retraction of an earlier calculation which related Pi-electron structure to inhibition of photosynthesis"

Proc. Nat. Ac. Sc. 1965, **54** 1285

KARR (M.R.), GARRIGUS (U.S.), HATFIELD (E.E.), NORTON (H.W.), et DOANE (B.B.)

"Nutritional and chemical evaluation of urea and of biuret in complete ensiled finishing diets by lambs"

J. Animal Sc. 1965, **24** 469.

KAWERAU (E)

"Biochemical analysis with the spekker absorptiometer - I - Estimation of urea, citrulline, allantoin and related carbamido compounds"

Scient. Proc. Roy. Dublin. Soc. 1946, **24** 63-70

KIDO (Y)

"The color reaction of organic compounds with dimethylglyoxime IV - Detection of some pyrimidines and purines"

Chem. Abstr. 1958, **52** 15348 h.

KITAMURA (M) et IUCHI (I)

"An improved diacetylmonoxime method for the determination of urea in blood and urine"

Clin. Chim. Acta. 1959, **4** 701.

KNIGHTS (E.M.)

"Blood urea nitrogen"

Grune-Stratton Ed. New-York-London. 1957.

KNIVETT (V.A.)

"The effect of arsenate on bacterial citrulline breakdown"

Biochem. J. 1954, **56** 606-610.

KORITZ (S.B.) et COHEN (P.P.)

"Colorimetric determination of carbamylamino acids and related compounds"

J. Biol. Chem. 1954, **209** 145-150.

KORNEGAY (E.T.), MILLER (E.R.), ULLREY (D.E.), VINCENT (B.H.) et HOFFER (J.A.)

"Influence of dietary urea on performance, antibody production and hematology of growing swine"

J. animal Sc. 1965, **24** 951.

- KRAWCZYNSKA (H) et WALAJTYS (E)
 "Activity of ornithine-carbamyltransferase (O.C.T.) in the blood serum of children with rheumatic diseases"
 Clin. Chim. Acta. 1966, **13** 147-150.
- KREBS (H.A.), EGGLESTON (L.V.) et KNIVETT (U.A.)
 "Arsenolysis and phosphorolysis of citrulline in mammalian liver"
 Biochem. J. 1955, **59** 185-193.
- KRISKA (M.), REINIS (S) et SUVA (J)
 "Influence of orotic acid on the hepatic parenchyma - VIII Changes of the localization of acid phosphatase and AS - esterase in the liver after application of orotic acid and vitamin B 12"
 Acta histochem. 1966, **23** 80-85.
- Von KUHNKE (E) et WIESNER (W)
 "Die Bestimmung der Harnstofflöslichkeit von Fibringerinnseln"
 Blut Z. Blutforschung. 1965, **11** 205-207.
- KULHANEK (V), MADEROVA (V), SINDELAROVA (D) et VOJTISKOVA (V)
 "Modified determination of ornithine-carbamyltransferase activity in biological material"
 Clin. Chim. Acta. 1963, **8** 579-585.
- KULHANEK (V) et VOJTISKOVA (V)
 "On the determination of ornithine-carbamyltransferase activity"
 Clin. Chim. Acta. 1964, **9** 95-96.
- LANG (K)
 "Über den Mechanismus der Diacetylreaktion von Guanidinen, ihre Umformung und Anwendung zur kolorimetrischen Bestimmung von Kreatin und Arginin"
 Z. Physiol. Chemie. 1932, **208** 273-280.
- LAFAIX (J.M.)
 "Une méthode spectro-photométrique améliorée pour le dosage de l'ornithine carbamyltransférase du sérum"
 Thèse Méd. Bordeaux. 1962.
- LAVAL (J)
 "Contribution à l'étude expérimentale de quelques effecteurs de l'activité arginasique"
 Thèse. Pharm. Clermont-Ferrand. 1961.
- LAZARE (J)
 "Etude de l'action des métavanadates sur la diphénylthiocarbazone et la diphénylcarbazone"
 Thèse. Pharm. Nancy. 1959.

- LECLERC (M) et SCHWARZ (L)
 "Essai d'utilisation de la réaction au diacétyl pour le dosage de l'urée sanguine"
 Ann. Biol. Clin. 1957, **15** 499.
- LECLERC (M)
 "Urée et principales épreuves rénales - IV - Réaction avec les dicétones alpha"
 Mises aux points biologiques - Vigot Frères. Ed. Paris 1962.
- LECLERC (M)
 "Le laboratoire au service de la Médecine"
 Diagrames. Editions du Cap. Monté Carlo. 1965 Nr 96.
- LECOQ (R)
 "Urée sanguine IV méthode à la diacétylmonoxime"
 Manuel d'Analyses médicales et de biologie clinique.
 Doin & Cie. Ed. Paris 1962.
- LELUAN (G)
 "Mise au point d'une technique simple de détermination de l'activité ornithine carbamyl transférasiqne dans le sérum"
 Ann. Biol. Clin. 1964, **22** 343-347.
- LE MAR (R.L.) et BOOTZIN (D)
 "Modification of the diacetyl determination of urea"
 Anal. Chem. 1957, **29** 1233-1234.
- LEVY (A.W.), TAYLOR (J.M.), HERZOG (I) et SCHEINBERG (L.C.)
 "The effect of hypertonic urea on cerebral Edema in the Rabbit induced by Triethyl Tin Sulfate"
 Arch. Neurol. 1965, **13** 58-64.
- LINTON (S.N.) et CAMPBELL (J.W.)
 "Studies on urea cycle enzymes in the terrestrial snail. *Otala lactea*"
 Arc. Biochem. Biophys. 1962, **97** 360-369.
- LUND (L.O.), BECKWITT (H.J.), GROVER (R.F.) et VIRTUE (R.W.)
 "Effect of hyperventilation, Hypothermia and Urea on Circulation and Cerebrospinal Fluid Pressure in the Dog"
 Anesthesiology. 1965, **26** 45-48.
- Mac CLESKEY (J.E.)
 "Fluorometric Method for the Determination of urea in blood"
 Anal. Chem. 1964, **36** 1646-1648.

- Mac CREA (J.F.) et LONGHLIN (J.O.)
 "Effect of concentrated urea solutions on the infectivity and hemagglutinin of vaccinia virus"
 Nature. 1959, **184** 1497.
- Mac KENZIE (H.A.), SMITH (M.B.) et WAKE (R.G.)
 "Molecular weight of ovalbumine and of bovine serum albumine in urea solution"
 Nature. 1955, **176** 738.
- Mac LEAN (P), NOVELLO (F) et GURNEY (M.W.)
 "Some observations on the colorimetric determination of citrulline and urea"
 Biochem. J. 1965, **94** 422-426.
- MANNING (R.T.) et GRISOLIA (S)
 "Serum Arginase activity"
 Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1957, **95** 225-226.
- MANOVA (I), DOLEZAL (V) et KACL (K)
 "Die Mikrobestimmung von Harnstoff mit Benutzung der Papierstreifchendeproteinisation"
 Z. inn. Med. 1963, **18** 1051-1052.
- MARSH (W.H.), FINGERHUT (B) et KIRSCH (E)
 "Determination of urea nitrogen with the diacetyl method and an automatic dialyzing apparatus"
 Am. J. Clin. Path. 1957, **28** 681.
- MARSCH (W.H.), FINGERHUT (B) et MILLER (H)
 "Automated and Manual direct methods for the determination of blood urea"
 Clin. Chem. 1965, **11** 624-627.
- MARSCH (D.J.), FRASIER (C) et DECTER (J)
 "Measurement of urea concentrations in nanoliter specimens of renal tubular fluid and capillary blood"
 Anal. Biochem. 1965, **11** 73-80.
- MICHON (J) et ARNAUD (R)
 "Dosage colorimétrique rapide de l'urée sanguine"
 Clin. Chim. Acta. 1962, **7** 739.
- MISTRY (S.P.) et GRILLO (M.A.)
 "Rat liver carbamyl transferases and biotin"
 Biochim. Biophys. Acta. 1960, **41** 166-167.

- MOCKLER (M.P.), MENE BROKER (L.R.), HUMOLLER (F.L.) et BARAK (A.J.)
 "Determination of citrulline in plasma"
 Clin. Chem. 1960, **6** 291-298.
- MOMOSE (T), OHKURA (Y) et TOMITA (J)
 "Determination of urea in blood and urine with diacetyl monoxime-glucurono-lactone reagent"
 Clin. Chem. 1965, **11** 113-121.
- MONNIER (D) et HAERDI (W)
 "Un dosage très sélectif du nickel avec la cyclohexanedione dioxime"
 Anal. Chim. Acta. 1959, **20** 444-455.
- MOORE (J.J.) et SAX (S.M.)
 "A revised automated procedure for urea nitrogen"
 Clin. Chim. Acta. 1965, **11** 475-477.
- MORA (J), TARRAB (R), MARTUSCELLI (J) et SOBERON (G)
 "Characteristics of arginases from ureotelic and non-ureotelic animals"
 Biochem. J. 1965, **96** 588-594.
- MORETTI (G.F.), STAEFFEN (J), DEMANGE (G), BALLAN (P) et GACON (J)
 "L'activité ornithine-carbamyl-transférase du sérum. Son intérêt clinique en pathologie hépato-biliaire"
 Presse Med. 1960, **68** 1177-1179.
- MORETTI (G.F.), STAEFFEN (J), DEMANGE (G), BALLAN (P) et ROUSSEAU (J)
 "La charge enzymatique endo-hépatique et son gradient hépatosérique"
 Presse Med, 1960, **58** 2278-2281.
- MORETTI (G.F.), STAEFFEN (J), DEMANGE (G), BALLAN (P) et ROUSSEAU (J)
 "L'ornithine carbamyl-transférase du sérum en clinique hépatologique"
 Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1961, **6** 147-154.
- MORETTI (G.F.), MAHON (R), STAEFFEN (J), BALLAN (P), CATANZANO (G) et VANDENDRIESCHE
 "Supériorité du dosage de l'O.C.T. sur le dosage des transaminases pour la mise en évidence de la souffrance hépatique liminaire"
 Ann. Biol. Clin. 1963, **21** 573-582.
- MORETTI (G), DUHAMEL (J), STAEFFEN (J), BALLAN (P), CATANZANO (G) et BROUSTET (A)
 "Clearance sérique d'une ornithine carbamyl transférase extra-
 tive"
 Rev. Fr. Et. Clin. Biol. 1966, **11** 266-273.

MULLER (H)

"Über den Mechanismus der Diacetylreaktion"
Z. Physiol. Chemie. 1935, **232-233** 276-280.

MURAYAMA (M)

"A micromodification of Archibald's colorimetric determination of urea"
J. Lab. Clin. Med. 1952, **39** 795-901.

NATELSON (S), SCOTT (M.L.) et BEFFA (C)

"A rapid method for the estimation of urea in biologic fluids"
Americ. J. Clin. Path. 1951, **21** 275.

NOVAK (M)

"Ultramikrometody K stanovení některých biochemických ukazatelů lipidového dusíkového a glycidového metabolismu v Krvi"
Ceskoslovenska Fysiologie. 1961, **5** 423-437.

O'BRIEN (D) et IBBOT (F.A.)

"Ultramicro determination of blood urea nitrogen - II - Diacetyl method"
Laboratory Manual of pediatric micro and ultramicro biochemical Techniques.
Hoeber Med. Division - Harper et Row - New-York, 3ème Ed. 1962, **9** 323.

O'MEARA (R.A.Q.)

"A simple delicate and rapid method of detecting the formation of acetylmethylcarbinol by bacteria fermenting carbohydrate"
J. Path. Bact. 1931, **34** 401.

OREKHOVIC (V.N.) et TUSTANOVSKIJ (A.A.)

"Méthode de détermination par titrage de l'urée et de la citrulline dans les tissus et liquides de l'organisme"
Biokhimija. 1949, **14** 444-448.

ORMSBY (A.A.)

"A direct colorimetric method for the determination of urea in blood and urine"
J. Biol. Chem. 1942, **146** 595.

PACKETT (L.V.) et GROVES (T.D.D.)

"Urea recycling in the ovine"
J. animal Sc. 1965, **24** 341.

- PAPPIUS (H.M.) et DAYES (L.A.)
 "Hypertonic Urea - Its effect on the Distribution of Water and Electrolytes in Normal and Edematous Brain Tissues"
 Arch. Neurol. 1965, **13** 395-402.
- PEARL (D.C.) et DERMOTT Mc (W.V.)
 "A vulnerable and Rate limiting Steep in urea synthesis in Patients with Hyperammoniaemia"
 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1958, **97** 440-443.
- PECHAR (J), HRADILOVA (L) et PLACER (W)
 "Colorimetric estimation of urea with the tryptophan diacetyl-reagent"
 Chem. Abst. 1954, **48** 137.
- PECHMANN Von (H)
 "Studien über 1-2 diketone"
 Berichte. 1888, **21** 1411.
- PELLERIN (J)
 "Lettre à l'éditeur"
 Clin. Chem. 1964, **10** 374-375.
- PERROT (L)
 "Sur le dosage colorimétrique de l'urée par la diacétylmonoxime"
 Ann. Pharm. Franc. 1955, **13** 161-162.
- PERROT (L)
 "Le dosage de l'urée"
 Lyon Pharm. Mai 1958, n° 5.
- PERROT (L) et VELAY (M)
 "Une réaction colorée de l'urée. Application à son dosage biologique"
 IX Congrès des Soc. de Pharm. de France. 1958.
- PIEN (J), BAISSÉ (J) et MARTIN (R)
 "Contribution à l'étude du diacétyle"
 Le lait 1936, **16** 119-138 et 243-256.
- PIEN (J), BAISSÉ (J) et MARTIN (R)
 "Le dosage du diacétyle dans les beurres"
 Le lait 1937, **17** 673-698.
- POMERANZ (Y)
 "Dispersibility of wheat proteins in aqueous urea solutions - a new parameter to evaluate breadmaking potentialities of wheat flours"
 Journ. Sc. food & Agriculture 1965, **16** 586.

- RAPPE (Ch)
 "The bromination of 3-bromocyclopentane - 1-2dione"
 Acta Chemica Scandinavica. 1965, **19** 274-276.
- RATNER (S)
 "Enzymatic synthesis of arginine"
 Methods in enzymology
 Academic Press. Edit. New-York. 1955 - Tome II 356.
- REGOECZI (E)
 "Übersichten über die Bestimmung des Harnstoffumsatzes in vivo"
 Klinische Wochenschrift. 1965, **43** 1127-1134.
- REICHARD (H) et REICHARD (P)
 "Determination of ornithine carbamyl transferase in serum"
 J. Lab. Clin. Med. 1958, **52** 709-717.
- REISSMANN (K.R.), BOLEY (J), CHRISTIANSON (J.F.) et DELP (M.H.)
 "The serum iron in experimental hepatocellular necrosis"
 J. Lab. Clin. Med. 1954, **43** 572-582.
- RICHTER (H) et LAPOINTE (Y)
 "A simple method for the determination of blood urea nitrogen,
 with special reference to automatic colorimetric analysis"
 Clin. Chem. 1959, **6** 617-620.
- RICHTER (H) et LAPOINTE (Y)
 "New reagent for use in determination of blood urea nitrogen, with
 special reference to manual analysis"
 Clin. Chem. 1962, **8** 335.
- ROBINSON (D.R.) et JENCKS (W.P.)
 "The effect of compounds of the Urea-Guanidinium Closs on the
 Activity Coefficient of Acetyltetraglycine Ethyl ester and related
 compounds"
 J. A. Chem. Soc. 1965, **87** 2462.
- ROIJERS (A.F.M.) et TAS (M.M.)
 "The determination of urea with p-dimethyl-aminobenzaldehyde"
 Clin. Chim. Acta. 1964, **9** 197-202.
- ROOS (F) et SIEST (G)
 "Etude des complexes colorés donnés par les dérivés guanidiques
 avec les dicétones"
 Bull. Acad. Soc. Lorr. Sc. 1965, **5** 23-37.

- ROSENTHAL (H.L.)
 "Determination of urea in blood and urine with diacetylmonoxime"
 Anal. Chem. 1955, **27** 1980.
- SAIFER (A) et AUERBACH PASCAL (T)
 "Immunochemical studies of human serum components obtained
 with urea-starch gel electrophoresis"
 Clin. Chim. Acta. 1965, **11** 523-529.
- SARDOU (R)
 "Dosage de l'urée par la diacétylmonoxime"
 Ann. Biol. Clin. 1958, **16** 53.
- SCHICK (M.J.) et GILBERT (A.H.)
 "Effect of urea guanidinium chloride, and dioxane on the C.M.C.
 of branchedchain nonionic detergents"
 J. colloid Sc. 1965, **20** 464-472.
- SELA (M), WHITE (F.H.) et ANFINSEN (C.B.)
 "The reductive cleavage of disulfide bounds and its application
 to problemes of protein structure"
 Bioch. Biophys. Acta. 1959, **31** 417.
- SHANTZ (E.M.) et STEWARD (F.C.)
 "The identification of compounds a from coconut milk as a 1-3
 diphenylurea"
 J. Am. Chem. Soc. 1965, **77** 6352.
- SIEST (D), SIEST (G) et BESSON (S)
 "Simplification du dosage des acides aminés urinaires par le ninhy-
 drine : avantages de l'éthylène-glycol comme solvant"
 Bull. Soc. Pharm. Nancy. 1961, **51** 19-23.
- SIEST (G) et SIEST (D)
 "Origine et étude des techniques de dosage de l'urée par la dia-
 cétylmonoxime. Examen de l'une d'entre elles"
 Bull. Soc. Pharm. Nancy. 1960, **47** 5.
- SIEST (G)
 "Influence des protéines sur la réaction colorée de l'urée avec
 l'alpha-isonitroso propiophénone"
 Bull. Soc. Pharm. Nancy. 1961, **48** 19-25.
- SIEST (G)
 "Réaction colorée photostable de l'urée avec la cycloheptanedio-
 nedioxime (Heptoxime) et application à son dosage"
 Bull. Soc. Pharm. Nancy. 1961, **49** 9-14.

- SIEST (G)
 " Etude de la réaction colorée de l'urée avec la cyclohexanedione. Essais d'application "
 Bull. Soc. Pharm. Nancy. 1963, **57** 1-8.
- SIEST (G)
 " Réactions colorées des dérivés carbamidés biologiques avec les dicétones acycliques et cycliques. Influence des oxydants "
 Bull. Acad. Soc. Lorr. Sc. 1963, **3** 42-58.
- SIEST (G)
 " Essais de dosage colorimétrique spécifique de l'acide urique "
 Bull. Soc. Pharm. Nancy. 1965, **64** 55-67.
- SIEST (G) et SIEST (D)
 " Glycémie - Urémie - Uricémie. Choix de méthodes colorimétriques de dosage "
 Bull. Soc. Pharm. Nancy. 1965, **67** 32-53.
- SIMPSON (R.B.) et KAUTZMANN (W)
 " The Kinetics of protein denaturation - I - The behavior of the optical rotation of ovalbumin in urea solutions "
 J. Am. Chem. Soc. 1953, **75** 5139.
- SKEGGS (L.T.)
 " An automatic method for colorimetric analysis "
 Am. J. Clin. Path. 1957, **28** 311-322.
- SMITH (G.S.)
 " Colour reactions of carbazides and carbamides with diacetyl and diacetyldioxime "
 The Analyst. 1935, **60** 171-172.
- STERMAN (M.D.) et FOSTER (S.F.)
 " Conformation Changes in bovine plasma albumin associated with hydrogen ion and urea binding "
 J. Am. Chem. Soc. 1956, **78** 3652.
- THOAI (N.V.) et ROCHE (J)
 " Biochimie du groupement guanidique "
 Exp. Ann. Biochim. Med. 1956, **18** 165-185.
- TIMMERMANS (C.J.)
 " A rapid colorimetric assay for urea "
 Clin. Chim. Acta. 1962, **7** 887-889.

- VAN SLYKE (D.D.) et ARCHIBALD (R.M.)
 "Gasometric and photometric measurement of arginase activity"
 J. Biol. Chem. 1946, **165** 293.
- VELAY (M)
 "Etude de quelques réactions colorées de l'urée. Application à son dosage biologique"
 Thèse Pharm. Lyon. 1957.
- VIGNERON (Cl) et SIEST (G)
 "Le dosage de l'urée par la diacétylmonoxime au moyen de l'auto-analyseur. Essais d'un réactif phosphoferrique"
 Bull. Soc. Pharm. Nancy. 1966, **70** 32-39.
- VIGNERON (M)
 "Conformations et comportements des protéines" Amino acides - Peptides - Protéines.
 Cahier n° 6 1966. A.E.C. Editeur Commeny France.
- VINCENT (D), ALOYR et GOBINET (R)
 "Sur l'arginase du sérum. I - Activation par les ions métalliques. II - Techniques de titration d'activité arginasique du sérum"
 Soc. Chim. Biol. 1941, **23** 1463-1468.
- VINCENT (D), PINCEMIN (J), DAUTY (R) et MOUTOU (A)
 "Recherches sur l'arginase"
 Bull. Soc. Chim. Biol. 1943, **25** 1015-1018.
- VINCENT (D) et PONTIER-HUC (J)
 "Présence d'arginase immédiatement active dans le sérum de cobaye"
 Compt. Rend. Soc. Biol. 1947, **141** 535-536.
- VINCENT (D) et SEGONZAC (G)
 "Le dosage de l'arginase sérique en pratique clinique"
 Rev. Franc. Et. Clin. Biol. 1960, **5** 390-392.
- VINCENT (D), SEGONZAC (G) et MARQUES-VINCENT (M.C.)
 "L'arginase erythrocytaire dans la cirrhose"
 Ann. Biol. Clin. 1963, **21** 799-804.
- VISUTAKUL (P)
 "Effects of urea on the biological activity of gonadotropin"
 Acta endocrin. 1965, **50** 114.

- VOGES (O) et PROSKAUER (B)
 "Beitrag zur Ernährungs physiologie und zur Differentialdiagnose
 der Bakterien der h morrhagischen Septic mie "
 Z. Hygiene 1898, **28** 20-32.
- VOTER (R.C.) et BANKS (C.V.)
 "Water soluble - 1-2 dioximes as analytical reagents "
 Anal. Chem. 1949, **21** 1320-1323.
- WALPOLE (G.S.)
 "The direct determination of creatine in pathological urine "
 J. Physiol. 1911, **42** 301-308.
- WATTS (D.C.), WATTS (R.L.), ALEXANDER (M.D.) et BALDWIN (E)
 "Determination of citrulline and urea in a mixture containing su-
 crose "
 Biochem. J. 1965, **96** 6c-7c.
- WEARNE (J.T.)
 "A note on urea estimation by diacetyl monoxime "
 J. Clin. Path. 1958, **11** 367.
- WHEATLEY (V.R.)
 "An improved diacetyl reaction for the estimation of urea in blood "
 Biochem. J. 1948, **43** 420-422.
- WHITE (A.G.C.), KRAMPITZ (L.O.) et WERKMAN (C.H.)
 "Method for the direct determination of diacetyl in tissue and bac-
 terial filtrates "
 Arch. Biochem. 1946, **9** 229-234.
- WILKINSON (J.S.) et HARVEY (D.G.)
 "Simple Screening tests for blood sugar and blood urea "
 Brit. Vet. J. 1958, **114** 382-388.
- WINGO (W.J.) et DAVIS (O.L.)
 "Probable absence of citrulline from proteins "
 Soc. Exp. Biol. and Med. 1949, **72** 415-418.
- WITH (T.K.), PETERSON (T.D.) et PETERSON (B)
 "A simple spectrophotometric method for the determination of urea
 in blood and urine "
 J. Clin. Path. 1961, **4** 202-204.
- WITHYCOMBE (W.A.), PLUMMER (D.T.) et WILKINSON (J.H.)
 "Organ specificity and lactate dehydrogenase Activity "
 Biochem. J. 1965, **94** 384-389.

WOLF (F)

"Méthode de dosage oxydimétrique du diacétyl"
Fresenius Z. Analyt. Chem. 1960, **172** 413-423.

WOOTON (I.D.P.)

"Autoanalyzer methods : Urea"
Microanalysis in medical biochemistry
Churchill. Ed. Londres. 1964.

YOUNG (E.G.) et CONWAY (C.F.)

"On the estimation of allantoïn by the Rimini Schryver Reaction"
J. Biol. Chem. 1942, **142** 839-853.

ZIMMERMAN (H.J.) et MAO (R)

"Cytotoxicity of carbon tetrachloride as measured by loss of cellular enzymes to surrounding medium"
Am. J. Med. Sc. 1965, **250** 688-692.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE

ETUDE DES REACTIONS COLOREES DES DERIVES CARBAMIDES AVEC LE DIACETYLE, LA PHENYLPROPANEDIONE ET LEURS OXIMES

Historique	11
Tableau synoptique des techniques existantes	14
Chapitre I : Etude des acides dans la réaction urée-diacétylmonoxime	26
I - Sensibilité de la réaction en fonction de l'acide	26
II - Influence de la nature et de la concentration des acides	28
Intensité de la réaction	29
Cinétique de la réaction	30
Stabilité	35
III - Effets de l'emploi simultané de deux ou plusieurs acides	35
Le mélange acide phosphorique-acide sulfurique..	35
Effets des additions d'acide sulfosalicylique ou paratoluènesulfonique aux autres milieux acides..	36
Effets de l'addition d'acide nitrique à l'acide phosphorique	36
Effets de l'addition d'acide arsénique à d'autres acides	36
IV - Etude du réactif arsénicosulfurique	39
Intensité de coloration en fonction de la quantité de réactif	40
Cinétique de la réaction	40
Stabilité des colorations	40
Conclusion	43
Chapitre II : Etude de la diacétylmonoxime, réactif de l'urée	44
I - Définition du réactif à la diacétylmonoxime	44
Intensité de coloration en fonction de la quantité de diacétylmonoxime	45
Cinétique et stabilité des réactions colorées en fonction de la quantité de diacétylmonoxime	47
II - Réactions colorées développées à température inférieure à 100°	48
Conclusion	51

Chapitre III : Etude des composés interférant dans la réaction urée-	
diacétylmonoxime	52
A - Les substances oxydantes et réductrices	52
I - Effets des oxydants ajoutés avant le chauffage	53
II - Oxydants ajoutés après le chauffage	57
Etude particulière de la chloramine en milieu	
phosphorique	58
III - Influence de réducteurs ajoutés avant le chauffage	60
Conclusion	62
B - Sels métalliques	64
I - Recherche des effets éventuels de divers sels métalli-	
ques	65
Milieu chlorhydrique	67
Milieu phosphorique	67
Milieux sulfosalicylique et paratoluènesulfo-	
nique	68
II - Etude particulière de l'intervention des sels métalliques	
dans la cinétique de la réaction	69
C - Solvants organiques	76
I - Influence des alcools	76
II - Influence de cétones et éthers	76
D - Divers adjuvants	80
I - Etude comparative de quelques substances intensifian-	
tes dans différents milieux acides	82
Réactions en milieu arsénicosulfurique	84
Réactions en milieu phosphorique	85
Réactions en milieux sulfosalicylique et parato-	
luènesulfonique	86
II - Etude particulière du thiosemicarbazide	87
III - Etude particulière du tryptophane	88
IV - Etude particulière de la phénazone (antipyrine)	91
V - Etude particulière de la glucuronolactone	94
Conclusion	95
Chapitre IV : Etude de la réaction colorée urée-diacétyl	96
I - Influence des acides sur la réaction urée-diacétyl	96
II - Influence de la concentration en diacétyl	97
III - Influence de l'addition de différents composés	99
IV - Utilisation d'une température de 37° pour développer	
la réaction urée-diacétyl	100
Conclusion	102
Chapitre V : Etude de la réaction colorée urée-diacétyldioxime	103
I - Essais effectués avec des solutions de diacétyldioxime	
dans les acides	103
Concentration optima en acide	103
Concentration optima en diacétyldioxime	105

Cinétique des réactions urée-diacétyldioxime.....	105
Etude des composés interférant dans la réaction	105
II - Essais effectués avec des solutions de diacétyldioxi- me dans des solvants organiques	108
Solution dans l'éthanol ou l'éthylèneglycol	108
Solution acétonique de diacétyldioxime	109
Conclusion	111
Chapitre VI : Etude des réactions colorées avec la phénylpropanedione et ses oximes	112
I - Réaction urée-phénylpropanedione	113
Recherche de la concentration optima en dicé- tone	113
Concentration optima en acide	114
Cinétique de la réaction urée-phénylpropanedio- ne	116
Influence des substances trouvées interférentes avec le diacétyle et ses oximes	116
II - Réaction urée-phénylpropanedionemonoxime	118
Recherche de la concentration optima en phényl- propanedionemonoxime	118
Influence des acides	118
Cinétique de la réaction	119
Influence des substances trouvées intensifiantes pour les précédentes dicétones	119
Conclusion	121
Chapitre VII : Etude de la photosensibilité et de la photostabilité des réactions colorées urée-alpha-dicétones	122
I - Photosensibilité des colorations pendant le chauffage...	123
II - Photostabilité des réactions colorées après leur déve- loppement	124
Influence du réactif acide sur la photostabilité	124
Influence du réactif dicétonique	126
Influence de substances interférentes	127
Influence de la température de développement de la réaction	131
Conclusion	132
Conclusion de la Première Partie	134

DEUXIEME PARTIE

NOUVELLES REACTIONS COLOREES DES DERIVES CARBAMIDES AVEC DES DICETONES CYCLANIQUES

Chapitre I	: Etude de la réaction urée-heptoxime	137
I	- Influence des acides	137
	Concentration optima en acides phosphorique et sulfurique	139
	Essai d'utilisation simultanée d' AsO_4H_3 et SO_4H_2	139
II	- Concentration en heptoxime	141
III	- Substances interférentes	143
IV	- Photostabilité et photosensibilité	143
	Conclusion	145
Chapitre II	: Etude de la réaction urée-cyclohexanedione	146
I	- Influence des acides	146
II	- Concentration en cyclohexanedione	146
III	- Evolution de la réaction urée-cyclohexanedione	147
	Influence des acides	147
	Influence de la concentration en cyclohexane- dione	149
	Effet de la température	149
IV	- Influence des solvants organiques	150
	Conclusion	151
Chapitre III	: Etude de la réaction urée-nioxime	152
I	- Influence des acides	152
II	- Réactif dicétonique	155
III	- Essais avec différentes substances susceptibles d'in- terférer dans la réaction	155
	Composés oxydants et réducteurs	156
	Sels métalliques	157
	Solvants organiques	157
	Divers adjuvants	158
IV	- Réactions colorées développées à 100°	159
V	- Photosensibilité et photostabilité des colorations	159
	Conclusion	162
	Conclusion de la Deuxième Partie	164

TROISIEME PARTIE

HYPOTHESES SUR LA NATURE DES COMPLEXES COLORES

Chapitre I	: Etude des dicétones	168
I	- Dicétones donnant une réaction positive ou négative	169
II	- Réactivité des oximes	169
	Hydrolyse de la diacétylmonoxime et de la diacé- tyldioxime (étude spectrale)	173
	Hydrolyse de la nioxime	175
	Conclusion	176

Chapitre II : Etude des réactions colorées de dérivés substitués de l'urée	177
A - Etude des réactions des dérivés carbamidés avec chaque dicétone	180
I - Réactions avec le diacétyle et la diacétylmonoxime	180
II - Réactions avec la phénylpropanedione et sa monoxime	182
III - Réactions avec l'heptoxime	184
IV - Réactions avec la cyclohexanedione	185
V - Réactions avec la nioxime	187
Conclusion	189
B - Etude particulière de la citrulline, de l'allantoïne et de l'acide allantoïque	192
I - Citrulline	192
II - Allantoïne et acide allantoïque	197
Etude de la réaction allantoïne-diacétylmonoxime	197
Etude de la réaction acide allantoïque-diacétylmonoxime	198
Chapitre III : Etude par la méthode des variations continues de Job	200
I - Applications de la méthode de Job aux réactions urée-alpha-dicétones	201
Réactions colorées se développant à 100°	201
Réactions colorées se développant à 37°	209
II - Etude en présence de substances interférentes	211
Avec la diacétylmonoxime	211
Avec la nioxime	215
III - Applications de la méthode de Job aux dérivés substitués de l'urée	216
Conclusion	217
Conclusion de la Troisième Partie	218

QUATRIEME PARTIE

APPLICATIONS BIOLOGIQUES

I - Le dosage de l'urée	222
A - Dosages de l'urée après défécation (ou dialyse)	225
Dosage de l'urée par la diacétylmonoxime en milieu arsénicosulfurique	225
Dosage de l'urée par la diacétylmonoxime en milieu phosphoferrique	229
Dosage de l'urée par la phénylpropanedionemonoxime en milieu phosphorique	231
Dosage de l'urée par l'heptoxime	234

B - Dosages de l'urée sanguine sans défécation préalable....	238
Dosage de l'urée sans défécation par la diacétylmonoxime en présence de thiosemicarbazide	239
Dosage de l'urée sans défécation par la diacétylmonoxime en présence de phénazone	241
C - Dosage de l'urée urinaire par la nioxime	242
II - Le dosage de la citrulline	246
Technique de dosage par la diacétylmonoxime en milieu arsénicosulfurique	249
III - Réactivité des bases pyrimidiques et puriques et de leurs produits d'hydrolyse	251
Essais avec l'acide orotique	251
Essais avec l'acide urique, l'allantoïne et l'acide allantoïque	251
Réactivité de l'acide urique	253
Réactivité de l'allantoïne	254
Réactivité de l'acide allantoïque	256
Conclusions Générales	257
Bibliographie	261
Table des matières	

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

THERAPEUTIQUE DE LA GOUTTE
ANTIMETABOLITES - ANTIENZYMES

UNIVERSITE DE NANCY

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

Présentée par Gérard SIEST
Né le 13 mai 1936 à HAYANGE (Moselle)
Nationalité : Française
et portant le titre :

ETUDE DES REACTIONS COLOREES DE L'UREE ET
DES DERIVES CARBAMIDES AVEC DES ALPHA-DICETONES
APPLICATIONS BIOLOGIQUES

Vu :
Nancy, le 1 Décembre 1966
Le Président de Thèse

Vu et Approuvé
Nancy, le 5 Décembre 1966
Le Doyen de la Faculté

J. SOLEIL

A. BERNANOSE

Vu et Permis d'imprimer
Nancy, le 13 Décembre 1966
Le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de L'UNIVERSITE

P. IMBS

Cet exemplaire est imprimé
à des fins particulières et ne
peut en aucun cas être vendu.

Achevé d'imprimer le 24 Juin 1967
à l'atelier de Documentation Universitaire
3, Rue Sellier, 3 NANCY

Dépot légal N° 282 Faculté de Pharmacie Editeur
2ème trimestre 1967

